

AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN
ZUR ZELLPROLIFERATION
IN DER REGENERIERENDEN RATTENLEBER
NACH HYDROXYHARNSTOFF-BEHANDLUNG

Doreliese Tuczek

1977
—

Dissertations- und Fotodruck Anneliese SCHUBERT
8 München 5 • Corneliusstraße 21 • Tel.: 268177

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. M. Eder

AUTORADIOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ZELLPROLIFERATION

IN DER REGENERIERENDEN RATTENLEBER NACH HYDROXY-
HARNSTOFF-BEHANDLUNG

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Doreliese Tuczec

aus

München

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Professor Dr. med. H. M. Rabes

Mitberichterstatter: Professor Dr. med. M. Eder

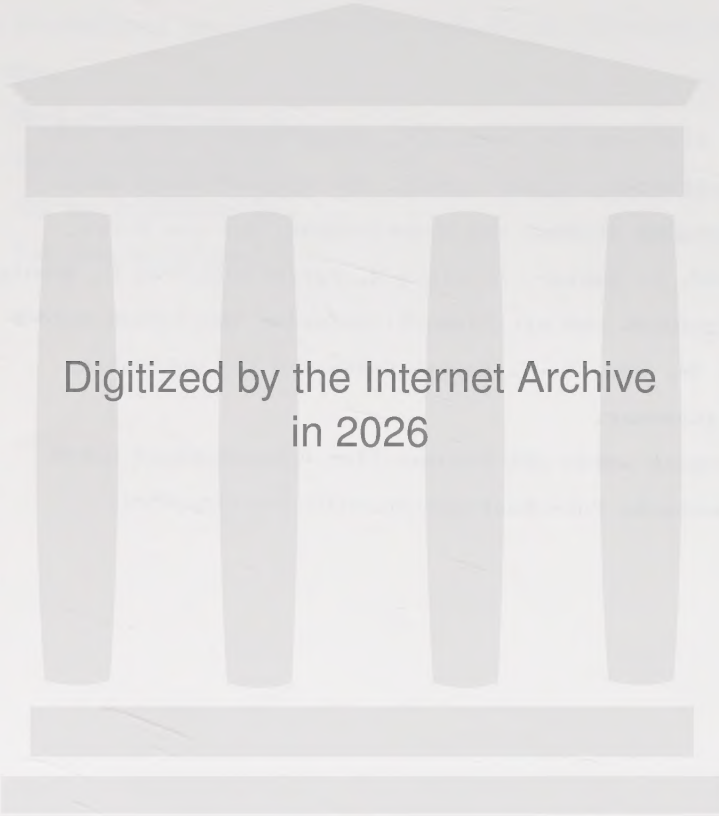
Dekan: Professor Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.7.1977



Herrn Professor Dr. med. H.M. Rabes danke ich für die Themenstellung dieser Arbeit. Die ausgewerteten Autoradiogramme stammen von Experimenten, die von Herrn Dr. med. G. Iseler, Fräulein R. Kerler und Frau E. Schülgen durchgeführt und mir freundlicherweise überlassen wurden. Herrn Dr. med. H.-V. Tuzcek danke ich für wertvolle Unterstützung.

Die Arbeit wurde mit finanzieller Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft durchgeführt.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555616_0050

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1. 1. Zur Proliferationskinetik der regenerierenden Rattenleber	8
1. 2. Zur Wirkung von Hydroxyharnstoff	15
2. MATERIAL UND METHODE	21
2. 1. Behandlung der Versuchstiere	21
2. 2. Autoradiographische Technik	22
2. 3. Quantitative Auswertung der Autoradiogramme	23
3. ERGEBNISSE	25
3. 1. Der ^3H -TdR-Markierungs- und Mitoseindex der Hepatocyten in der regenerierenden Rattenleber in Abhängigkeit von der Dauer der Hydroxyharnstoffinfusion	25
3. 2. Der ^3H -TdR-Markierungsindex der nicht parenchymatösen Zellen in der regenerierenden Rattenleber in Abhängigkeit von der Dauer der Hydroxyharnstoffinfusion	30
3. 3. Die intralobuläre Verteilung ^3H -TdR-markierter Hepatocyten sowie der Mitosen in der regenerierenden Rattenleber in Abhängigkeit von der Dauer der Hydroxyharnstoffinfusion	35
3. 4. Vergleich zwischen Wachstumsfraktion und Hydroxyharnstoff-induzierter Synchronisation DNA-synthetisierender Hepatocyten in der regenerierenden Rattenleber	43

4.	DISKUSSION	53
4. 1.	Zum Verhalten der ^3H -TdR- und Mitoseindices in der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoffinfusion	53
4. 2.	Zur Zeitdifferenz zwischen den ^3H -TdR-Markierungsindices der Hepatocyten und der nicht parenchymatösen Zellen in der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoffinfusion	58
4. 3.	Zur intralobulären Verteilung der ^3H -TdR- und Mitoseindices der Hepatocyten in der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoffinfusion	60
5.	ZUSAMMENFASSUNG	67
6.	LITERATURVERZEICHNIS	71

1. EINLEITUNG

In proliferierenden Zellsystemen läßt sich durch Anwendung autoradiographischer Untersuchungsmethoden, insbesondere des von Quastler und Sherman (1959) angegebenen Prozent-markierte-Mitose-Verfahrens, die Dauer der Mitosephase (t_M), der praesynthetischen (t_{G_1})- und der praemitotischen Phase (t_{G_2}) sowie die S-Phasendauer (t_S), während der die Replikation der DNA erfolgt, bestimmen. Die molekular-biologischen Ereignisse während dieser Zellzyklusphasen, die zum Wachstum beziehungsweise zur Teilung der Zellen führen, sind jedoch trotz zahlreicher Detailkenntnisse noch weitgehend ungeklärt. Ein wesentlicher Grund dafür ist darin zu suchen, daß innerhalb einer Population die einzelnen Phasen des Zellzyklus zeitlich unkoordiniert auftreten; die meisten Zellpopulationen proliferieren lediglich teilsynchronisiert oder vollkommen asynchron. Für biochemische Untersuchungen von Wachstumsvorgängen, ebenso wie für die zytostatische Therapie von Tumoren ist es jedoch notwendig, daß sich ein möglichst großer Anteil der untersuchten, beziehungsweise therapeutisch angegangenen Zellpopulation gleichzeitig in einer bestimmten Phase des Zellzyklus, z. B. in der DNA-Synthesephase, befindet.

Im weiteren Sinne wird das simultane Auftreten von Ereignissen als Synchronisation bezeichnet. Hieraus folgt, daß der Synchronisationsgrad ein Maß für die Anzahl gleichartiger Vorgänge je Zeiteinheit ist. Für den speziellen Fall einer weitgehend synchronisierten Population

DNA-synthetisierender Zellen bedeutet das, daß sich in einem bestimmten Zeitabschnitt möglichst viele Zellen der untersuchten Gesamtpopulation gleichzeitig in der S-Phase und nach Durchlaufen der praemitotischen G_2 -Phase in der Mitose befinden. Derartige Synchronisationsvorgänge kommen physiologischerweise vor, oder sie lassen sich experimentell erzielen. Während des Wachstums ist die Fraktion DNA-synthetisierender Zellen erhöht; so beträgt der ^3H -Thymidin-Markierungsindex der Hepatocyten der Leber ein Monat alter Ratten etwa 2 % (Stöcker et al., 1964) und sinkt bei zwei Monate alten, ausgewachsenen Tieren unter 0,3% ab (Grisham, 1962; Oehlert et al., 1962; Schultze, 1968; Rabes, 1969; Tucek und Rabes, 1975). Der Anteil DNA-synthetisierender Hepatocyten ist bei jungen Tieren erhöht, die Synchronie der DNA-Synthese verstärkt. Ähnliche Verhältnisse gelten auch für die Tubulusepithelien der Nieren sowie für die Zellen des exokrinen Pankreas (Stöcker et al., 1972). Auch in Abhängigkeit von der Tageszeit finden sich sowohl im Knochenmark (Sharkin et al., 1971) als auch in Lymphknoten (Sindelschikova, 1971), in der Epidermis (Cooper und Schiff, 1938; Cooper und Franklin, 1940; Scheving und Pauly, 1960; Krasilnikova, 1963 u. a.) sowie in der Darmschleimhaut (Sigdestad und Leshner, 1971), ja sogar in einigen Tumoren (Pilgrim et al., 1965; Pohle et al., 1961) eine unterschiedliche Anzahl proliferierender Zellen. Selbst in Geweben, die normalerweise nur eine sehr geringgradige Zellerneuerungsrate

besitzen, wie die Leber (Wilson, 1948; Halberg, 1957; Peters, 1962; Ruby et al., 1973) und die Niere (Blumenfeld, 1938), ließ sich eine circadiane Rhythmik der Mitoseindices nachweisen.

Auch in schnell proliferierenden Geweben, wie den Wechselgeweben, zu denen das Blut, die Haut und die Darmschleimhaut gerechnet werden, können vorübergehend unterschiedliche Synchronisationsgrade DNA-synthetisierender Zellen auftreten. Der Fluß von der G_1 - in die DNA-Synthese- bzw. aus der DNA-Synthesephase in das G_2 -Kompartiment beträgt zum Beispiel im Jejunum der Maus 7,15% je Stunde bezogen auf die proliferierenden Kryptenepithelzellen (Maurer et al., 1972; Schultze et al., 1972). Physiologischerweise befinden sich diese Zellen im Fließgleichgewicht, das bedeutet, daß die Anzahl der Zellen, die je Zeiteinheit in die DNA-Synthesephase bzw. Mitose eintreten, gleich der Zellzahl ist, die sie verlassen, so daß die Gesamtzahl des Gewebes konstant bleibt. Treten nun Störgrößen auf, die zur Zellvermehrung - wie z. B. bei der Hyperplasie - führen oder einen verstärkten Zellverlust bewirken, der durch Regenerationsvorgänge kompensiert werden muß, so ändert sich während dieser Umstellung der Fluß in die S-Phase bzw. aus dem Kompartiment DNA-synthetisierender Zellen und damit auch ihr Synchronisationsgrad bezogen auf die S-Phasenzellen. Solche Umstellungsvorgänge, die zu einer temporären Änderung des Synchronisationsgrades proliferierender Zellen führen, sind sehr häufig und stellen eine Anpassungsreaktion des Organismus an seine Umgebung dar. So wird zum Beispiel

die Menge der Erythrocyten durch den Sauerstoffgehalt geregelt (Necas und Neuwirt,1970), bei der Epidermis führt vermehrter Zellverlust durch Abziehen der oberflächlichen Epithellagen oder durch Wundsetzung vorübergehend zum Anstieg proliferierender Basalzellen (Pinkus,1952; Leblond und Walker,1956; Oehlert et al.,1956; Iversen et al.,1974 u.a.); auch bei der Darmschleimhaut bewirken unterschiedliche Faktoren eine temporäre Änderung der Proliferationsaktivität (Übersicht bei Eder,1966). Wird nun der Zeitabschnitt des Ungleichgewichts, das heißt des verstärkten oder verminderten Flußes in die DNA-Synthese oder Mitose, experimentell erfasst, so wird vorübergehend eine verstärkte oder verminderte Synchronisation der verschiedenen Zellzyklusphasen gefunden.

In allen diesen Beispielen findet sich vom Standpunkt der Zellproliferation aus gesehen, in Abhängigkeit von der Gewebsart, dem Alter der Tiere oder dem Tagesrhythmus eine mehr oder weniger ausgeprägte Partialsynchronie. Insgesamt reicht der Anteil DNA-synthetisierender Zellen im Verhältnis zur untersuchten Gesamtpopulation in diesen Systemen jedoch nicht aus, um molekularbiologische Untersuchungen zur Zellteilung beziehungsweise ihrer Vorbereitung durchführen zu können. Hierzu sind im wesentlichen zwei weitere Voraussetzungen notwendig: einmal muß der Anteil proliferierender Zellen im Verhältnis zur Größe der untersuchten Gesamtzellpopulation weiter erhöht werden, zum anderen sollte ein Zellsystem vorliegen, das sich durch einfache experimentelle Eingriffe von der

Proliferationsruhe in eine Zellpopulation hoher Proliferationsaktivität überführen läßt.

In der Gewebekultur kann man die erste Forderung vergleichsweise einfach erfüllen, so lassen sich beispielsweise von einem einschichtig auswachsenden Zellverband die Zellen in der Mitosephase, die weniger stark an der Unterlage haften, durch einfache Schüttelbewegungen abtrennen, so dass nach Abzentrifugieren eine Subpopulation von Zellen in der Mitosephase gewonnen wird (Terasima und Tolmach, 1963). Eine andere Möglichkeit besteht darin, die Zellen durch niedrige Konzentrationen von Colcemid in der Metaphase anzureichern (Stubblefield und Kleveos, 1965; Romsdahl, 1968) oder am Übergang von der G_1 - in die S-Phase durch halogenierte Pyrimidinanaloge wie Joddesoxyuridin oder 5-Fluordesoxyuridin (Post und Hoffman, 1969; Binkerd et al., 1964) vorübergehend zu blockieren. Eine ähnliche Wirkung lässt sich durch Methotrexat, das die Methylierung von Desoxyuridin und so über die mangelnde Bildung von Thymidin den Eintritt in die S-Phase hemmt, erzielen (Dalen et al., 1965; Margolis et al., 1971; Hoffman und Post, 1972). Außer den hier erwähnten sind noch zahlreiche weitere Substanzen bekannt, welche die Proliferation in verschiedenen Stadien des Zellzyklus hemmen (Übersicht bei Hoffman und Post, 1973). Werden sie zeitlich begrenzt angewandt, so gelangen die Zellen einer asynchron proliferierenden Population im Verlaufe ihres Zellzyklus an den Block und werden dort solange arretiert, bis die Hemmkonzentration der blockierenden Substanz unterschritten ist und ein Fortschreiten der

Zellen in ihrem Zellzyklus gestattet. In vitro lassen sich durch Anwendung dieser Methoden gute Synchronisationsgrade erzielen, da durch den Wechsel der Kulturmedien die Hemmkonzentration schnell unterschritten werden kann.

In den hier erwähnten Beispielen werden bereits proliferierende Zellen auf diese Weise verstärkt synchronisiert. Die zweite Forderung nach einem System, in dem der Übergang von einer sehr geringgradigen Proliferationsaktivität zur hohen Zellteilungsrate erfolgt, wird hier nicht erfüllt.

Hierzu muß auf andere Versuchsanordnungen zurückgegriffen werden; so wird zum Beispiel die Proliferation von Lymphocyten durch Phytohämagglutinin stimuliert (Monjardino und MacGillivray, 1970; Rubin und Cooper, 1965; Pogo und Katz, 1974), so daß die Vorgänge in der späten G_1 -Phase, die letztlich den Übertritt in die DNA-Synthesephase ermöglichen, untersucht werden können. In vivo wurden solche Fragestellungen an der regenerierenden Rattenniere nach temporärer Ischämie oder unilateraler Nephrektomie (Tomashefsky und Tannenbaum, 1969) sowie an der regenerierenden Rattenleber nach partieller Hepatektomie (Bollum und Potter, 1959; Beltz, 1962; Giudice und Novelli, 1963; Fujioka et al., 1963; Uchiyama et al., 1963; Rabes und Brändle, 1969; Tuzcek und Rabes, 1973 u.a.)

bearbeitet. Insbesondere das Modell der regenerierenden Rattenleber, bei dem durch eine Zweidrittel-Hepatektomie der Übergang von der Proliferationsruhe (G_0 -Phase) in die DNA-Synthese (S-Phase) im Restparenchym induziert wird, hat sich nicht zuletzt wegen der zur Verfügung stehenden, verhältnismäßig einfachen biochemischen Analyseverfahren

als geeignet erwiesen, die Vorgänge während der prae-proliferativen Phase, die zur DNA-Synthese führen, zu untersuchen. Der große Nachteil dieser in-vivo-Modelle ist jedoch - verglichen mit in-vitro-Systemen - der verhältnismäßig niedrige Synchronisationsgrad proliferierender Zellen.

Um diese Mängel auszugleichen, wurde daher versucht, den Synchronisationsgrad proliferierender Zellen in der regenerierenden Rattenleber nach partieller Hepatektomie durch eine verhältnismäßig kurzdauernde Blockade der Zellen am G_1 -S-Übergang durch Hydroxyharnstoff zu verstärken. Die hier vorgelegte Arbeit betrifft die quantitative Auswertung von Autoradiogrammen, die im Verlaufe dieser Versuche angefertigt und von Herrn Professor Dr. med. Rabes zur Verfügung gestellt wurden. Dabei werden sowohl der Anteil ^3H -TdR-markierter Hepatocyten, Bändergewebszellen, Gallengangsepithelien und Sinusuferzellen als auch die Anzahl der Mitosen in der regenerierenden Rattenleber nach partieller Hepatektomie und simultaner Applikation von Hydroxyharnstoff in Abhängigkeit von der postoperativen Versuchszeit und der intralobulären Lokalisation der Zellen bestimmt und mit bereits bekannten zellkinetischen Parametern der regenerierenden Leber ohne zusätzliche Synchronisation durch Hydroxyharnstoff verglichen. Um diese Gegenüberstellung durchführen zu können, soll im folgenden Abschnitt die Zellkinetik im Restparenchym der regenerierenden Leber nach Zweidrittelresektion beschrieben und im Anschluß daran kurz auf die Wirkungsweise und die Eigenschaften von Hydroxyharnstoff eingegangen

werden.

1. 1. Zur Proliferationskinetik der regenerierenden

Rattenleber

In der ruhenden Leber unbehandelter ausgewachsener Ratten befinden sich etwa 0,1 bis 0,26% der Hepatocyten in der DNA-Synthesephase (Grisham, 1962; Oehlert et al., 1962; Stöcker und Altmann, 1964; Schultze, 1968; Rabes, 1969 u. a.), während 0,01% bis 0,10% Mitosen anzutreffen sind (Brues und Marble, 1937; Bucher et al., 1950; Friedrich-Freska und Zaki, 1954; Jaffé, 1954; Hemingway und Cater, 1958; Grisham, 1962; Stöcker et al., 1964; Altmann, 1966 u. a.). Wird die Wachstumsfraktion (Mendelsohn, 1960 a,b; 1962 a,b) durch ^3H -TdR-Dauerinfusion oder durch intermittierende multiple Applikation von ^3H -TdR über einen längeren Zeitabschnitt bestimmt, so beträgt das Kompartiment DNA-synthetisierender Zellen nur etwa 1 - 2% der Hepatocyten (Stöcker, 1966; Fabrikant, 1968). Nach der standardisierten Zweidrittel-Hepatektomie (Higgins und Anderson, 1931) wird aus der ruhenden eine proliferierende Zellpopulation: 15 Std. bis 18 Std. nach partieller Leberresektion beginnt die DNA-Synthese je Zeiteinheit steil anzusteigen (Hecht und Potter, 1956, 1958; Grisham, 1962; Gerber und Remy-Defraigne, 1963; Edwards und Koch, 1964; Stöcker, 1966; Looney et al., 1967; Fabrikant, 1968; Rabes und Brändle, 1968, 1969; Tucek und Rabes, 1973a,b). Wird nun die Wachstumsfraktion bestimmt, so zeigt sich im Autoradiogramm, daß etwa 84-93% aller Hepatocyten ^3H -TdR inkorporiert haben (Grisham, 1962;

Stöcker, 1966; Fabrikant, 1969; Stöcker und Heine, 1971; Stöcker et al., 1972). Diese Zunahme des Kompartiments DNA-synthetisierender Zellen erfolgt innerhalb von 2,5 Tagen. Wird demgegenüber der ^3H -TdR-Markierungsindex nach Pulsmarkierung als Funktion der postoperativen Zeit angegeben, so zeigt sich, daß die DNA-Synthese innerhalb dieses Zeitabschnittes keineswegs synchron verläuft. Der Markierungsindex erreicht 24 Std. bis 28 Std. nach der Operation ein Maximum (Grisham, 1962; Oehlert et al., 1962; Bucher und Swaffield, 1964; Edwards und Koch, 1964; Brändle, 1966; Fabrikant, 1968; Rabes und Brändle, 1969; Tuczec et al., 1975 u.a.). Während dieser Zeit finden sich etwa 20% bis 30% der Hepatocyten in der S-Phase. Danach fällt die DNA-Synthese auf ein - im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren - erhöhtes Niveau ab, das auch nach 72 Stunden noch nachweisbar ist. Nach 32- und 48-stündiger Regenerationszeit beträgt der Markierungsindex rund 10% (Stöcker, 1966). Wird die Flußrate der Zellen vom G_1 - in das S-Kompartiment zu Beginn der DNA-Synthese nach Zweidrittelresektion bestimmt, so zeigt sich, daß zwischen der 17. und 18. Stunde nur eine geringgradige Zunahme des Zellflusses in die S-Phase stattfindet; während im Intervall 18 bis 20 Stunden im Mittel etwa 8,85% der Hepatocyten je Stunde in die DNA-Synthese eintreten (Tuczec und Rabes, 1973b). Nach diesem initialen Maximum gelangen nach Berechnungen von Fabrikant (1968) etwa 3% bis 4% der Hepatocyten je Stunde in die S-Phase. Der Mitosepeak, der dem DNA-Synthesemaximum mit einer zeitlichen Verzögerung von 6 bis 8 Stunden folgt,

(Grisham, 1962; Stöcker, 1966; Fabrikant, 1968) erreicht nach etwa 31 Stunden Werte von 3-4% (Tuczek et al., 1975). Diese Befunde zeigen, daß die Hepatocyten in der regenerierenden Rattenleber keineswegs gleichzeitig in die DNA-Synthese und Mitose eintreten. Betrachtet man nicht nur den durchschnittlichen ^3H -TdR-Markierungsindex der proliferierenden Leber als Funktion der postoperativen Regenerationszeit, sondern analysiert die Fraktion DNA-synthetisierender Zellen darüber hinaus noch nach ihrer Lokalisation innerhalb eines Leberazinus, so wird der relativ geringe Synchronisationsgrad proliferierender Hepatocyten nach partieller Hepatektomie noch deutlicher, darüberhinaus zeigt sich jedoch auch, daß in Abhängigkeit vom anatomischen Aufbau eines Leberläppchens, je nach Beziehung zum Blutgefäßsystem, unterschiedliche Grade der Synchronisation bestehen, die sich von Läppchenzone zu Läppchenzone mit fortschreitender Regenerationsdauer ändern. Während des physiologischen Zellersatzes läßt sich innerhalb eines Leberläppchens kein bevorzugter Ort für den Eintritt der Hepatocyten in die DNA-Synthesephase angeben (Oehlert et al., 1962; Fabrikant, 1968). Bei jungen Ratten proliferieren jedoch vom 7. Lebenstage an überwiegend die periportal gelegenen Zellen (Stöcker, 1968).

Nach partieller Hepatektomie beginnt die Proliferation ebenfalls in der Peripherie der Leberazini (v. Meister, 1894; Harkness, 1952; Zaki, 1954; Grisham, 1962; Oehlert et al., 1962; Edwards und Koch, 1964; Eder et al., 1965; Rabes et al., 1965; Fabrikant, 1968; Rabes und Brändle, 1968; u.a.).

Wenn die Leberläppchen nach dem Konzept von Rappaport und Mitarbeitern (1954) in eine periportale, intermediäre und perivenöse Zone untergliedert werden, so finden sich nach 18-stündiger Regenerationszeit mehr als 80% DNA-synthetisierender Zellen im periportal, 15% im intermediären und etwa 2% im perivenösen Abschnitt eines Leberazinus. Mit fortschreitender Regenerationszeit verschieben sich diese Verhältnisse zugunsten der intermediären und perivenösen Bereiche, so daß etwa 45 Std. nach der Operation keine zonalen Unterschiede in der intra-lobulären Verteilung ^3H -TdR-markierter Hepatocyten mehr festzustellen sind (Grisham, 1962; Fabrikant, 1968). Wird jedoch die Strecke zwischen Portalfeld und Ast der Vena hepatica in wesentlich kleinere, etwa 9-12 Untereinheiten gegliedert, so ergibt sich in Abhängigkeit von der Regenerationszeit für jede dieser Lobuluszonen eine charakteristische Verteilung ^3H -TdR-markierter, das heißt DNA-synthetisierender Hepatocyten (Rabes und Tuczek, 1970; Tuczek, 1970; Rabes et al., 1975, 1976). Analysiert man nun in gleicher Weise die intralobuläre Verteilung der S-Phasenzellen in kurzen Intervallen zu Beginn der Regeneration 18h bis 20h nach Teilhepatektomie, so zeigt sich, daß die DNA-Synthese nicht unmittelbar am Portalfeld beginnt, sondern daß bei einer Unterteilung der Azini in 10 Areale vom Portalfeld an gerechnet die Zonen 2 bis 4, die etwa der Zone I nach Rappaport entsprechen, die besten Bedingungen für den Eintritt in die DNA-Synthesephase bieten. Der Fluß vom G_1 - in das S-Kompartiment beträgt hier 18-19h nach

Zweidrittelresektion etwa 8%/h und im Intervall 19-20h rund 15%/h (Tuczek und Rabes, 1973b; Rabes et al., 1975).

Die Leber besteht zu 35% bis 40% aus nicht parenchymatösen Zellen wie Gallengangs- und Sinusuferzellen sowie Bindegewebszellen, sie beanspruchen aber insgesamt nur etwa 5% bis 10% des gesamten Zellvolumens (Harkness, 1957; Kosterlitz, 1958; Daoust, 1958; Cantrell und Bresnick, 1972, Weibel, 1969). Nach den Untersuchungen von Grisham (1962) erreichen die Gallengangsepithelien in der regenerierenden Rattenleber etwa 16h nach dem DNA-Synthesemaximum der Parenchymzellen ihre höchsten ^3H -TdR-Markierungsindices, die zu diesem Zeitpunkt etwa 20% betragen. Dabei weist die DNA-Synthese der Gallengangsepithelien jedoch einen wesentlich geringeren Synchronisationsgrad auf als die Hepatocyten: erst nach einem langsamen, etwa 24 Stunden dauernden Anstieg wird das Maximum des Markierungsindex erreicht; verglichen mit den Hepatocyten nimmt die DNA-Synthese der Gallengangsellen anschließend auch wesentlich langsamer ab. Ähnliches gilt für den Kurvenverlauf der Uferzellen, bei denen maximal 10% der Zellen nach ^3H -TdR-Pulsmarkierung gleichzeitig in der S-Phase anzutreffen sind. Über die intralobuläre Verteilung DNA-synthetisierender, nicht parenchymatöser Zellen in der regenerierenden Leber ist unseres Wissens nichts bekannt.

Aus den in diesem Kapitel dargestellten Befunden geht hervor, daß der ^3H -TdR-Markierungsindex im Vergleich zur ruhenden Leber zwar steil ansteigt und daß sich unter optimalen Bedingungen im Mittel etwa 25-30% der Hepatocyten

simultan in der DNA-Synthesephase befinden, daß sich aber je nach Regenerationsdauer und intralobulärer Zone unterschiedliche Synchronisationsgrade ergeben, deren Höhe insgesamt nicht ausreicht, um molekularbiologische Untersuchungen zum Übertritt der Zellen von der G_1 - in die S-Phase des Zellzyklus durchführen zu können.

In diesem Zusammenhang scheint es bemerkenswert, daß der Synchronisationsgrad proliferierender Zellen in der regenerierenden Rattenleber durch unterschiedliche Eingriffe modifiziert werden kann. Einmal hängt er vom Tagesrhythmus ab, ein Effekt, der erst nach Abklingen der initialen DNA-Synthesewelle zu Tage tritt (Klinge und Mathyl, 1969). In Abhängigkeit vom Alter der Versuchstiere ergeben sich ebenfalls unterschiedliche Synchronisationsgrade; so findet sich bei jungen Ratten ein hoher DNA-Synthesegipfel, der bei älteren Tieren nur geringere Werte erreicht, mit zeitlicher Verzögerung auftritt und eher plateauartig verläuft (Bucher und Swaffield, 1964).

Auch die Größe des Anteils des resezierten Lebergewebes beeinflusst den Synchronisationsgrad: durch Resektion von 8-9% der Lebermasse wird die Regeneration im Restparenchym nur wenig stimuliert (MacDonald et al., 1962; Bucher und Swaffield, 1964). Nach Entfernung von 1/3 des Lebergewebes wird die ^3H -TdR-Inkorporation weiter verstärkt, der Kurvenverlauf gleicht jedoch auch hier eher noch einem Plateau (Bucher und Swaffield, 1964). Erst nach Resektion von 43% der Lebermasse zeigt die ^3H -TdR-Inkorporation 22-26h nach der Operation eine signifikante initiale

Erhöhung, die sich unter den Bedingungen der Zweidrittel-Hepatektomie zu einem hohen Peak ausbildet (Bucher und Swaffield, 1964). Die Resektion weiteren Lebergewebes führt nun nicht zu einer Verstärkung des Synchronisationsgrades proliferierender Zellen, sondern nach Entfernung von 82% der Lebermasse verzögert sich der Beginn der DNA-Synthese im Vergleich zur Zweidrittelresektion und der Peak der ^{32}P -Inkorporation in die DNA wird wieder niedriger (Weinbren und Woodward, 1964). Werden etwa 90% der Lebermasse entfernt, beträgt der ^3H -TdR-Markierungsindex im Mittel nur noch etwa 0,49% (Tuczek, 1970; Tuczek und Rabes, 1971). Eine andere Situation ergibt sich, wenn nach Zweidrittelresektion zusätzlich hepatotoxische Substanzen wie Tetrachlorkohlenstoff oder Allylformiat appliziert werden. Unter diesen Bedingungen wird der Synchronisationsgrad der Zellproliferation im Vergleich zur Zweidrittelresektion ohne zusätzliche Schädigung weiter verstärkt, auch hier tritt jedoch der Gipfel der DNA-Synthese mit einer zeitlichen Verzögerung auf (Stöcker und Boecker, 1970; Rabes et al., 1968; Rabes und Tuczek, 1971). Wird bei allylformiat-vergifteter, partiell resezierter Rattenleber die intralobuläre Verteilung DNA-synthetisierender Hepatocyten in der oben beschriebenen Weise analysiert, so sind in Zonen mit optimalen Proliferationsbedingungen bis nahezu 80% der Hepatocyten in der DNA-Synthesephase (Rabes und Tuczek, 1971; Rabes et al., 1975). Selbst das primär nicht hepatotoxische Phenobarbital führt nach mehrfacher Gabe von 90mg/kg Körpergewicht in der

regenerierenden Leber zu einer initial verstärkten Synchronisation der DNA-Synthese (Tuczek et al., 1975). Aber unter allen diesen Bedingungen reicht der Synchronisationsgrad proliferierender Hepatocyten nicht aus, um mit biochemischen Methoden Fragen über zellzyklus-spezifische Vorgänge bei der Zellproliferation in Angriff nehmen zu können. Daher war es erforderlich, das Modell der regenerierenden Rattenleber in Bezug auf die Zellproliferation noch stärker zu synchronisieren. Die Applikation von Hydroxyharnstoff während der Regenerationsphase nach Zweidrittel-Hepatektomie schien ein möglicher Weg zu sein, dieses Ziel zu erreichen. Im folgenden Kapitel soll zunächst die Wirkung dieses Pharmakons eingehender beschrieben werden.

1.2. Zur Wirkung von Hydroxyharnstoff

Obwohl bereits 1869 Dresler und Stein Hydroxyharnstoff (HU) synthetisierten, dauerte es fast noch einhundert Jahre, bis die biologische Bedeutung dieser Substanz erkannt wurde. Erst vor wenigen Jahren wurde die hemmende Wirkung von HU auf das Wachstum maligner Tumoren beschrieben (Krakoff et al., 1964, 1968; Thurman et al., 1963; Thurman, 1964; Lerner und Beckloff, 1965; Klein et al., 1972; Klein und Lennartz, 1974). Die Beobachtung, daß HU in vitro sowohl bei Bakterien (Gale et al., 1964; Rosenkranz und Carr, 1966; Rosenkranz et al., 1966, 1967) als auch bei eukaryoten Zellstämmen (Gale, 1964; Mohler, 1964; Young und Hodas, 1964; Sinclair, 1965, 1967; Yabro et al., 1965 a,b; Kim et al., 1967; Pfeiffer und

Tolmach,1967; Lea et al., 1970; Rajewsky et al.,1971) die Proliferation hemmt, gestattet es, in diesen Systemen den Wirkungsmechanismus näher zu analysieren. Dabei stellte sich heraus, daß die Wirkung von Hydroxyharnstoff von der Zellzyklusphase abhängt und ein toxischer Effekt dieser Substanz weitgehend auf die S-Phase beschränkt ist (Sinclair, 1965,1967; Kim et al., 1967; Pfeiffer und Tolmach,1967; Bachetti und Whitmore,1969; Morse et al.,1969; Wheeler et al.,1972; Bhuyan et al.,1973). Diese Befunde machen verständlich, daß HU insbesondere für die schnell proliferierenden Wechselgewebe wie das lymphatische System (Philips et al.,1964, 1967), die Hämatopoese (Bohne et al., 1970; Schteml et al., 1974) und die Darmepithelien (Philips et al.,1967; Dethlefsen und Riley,1973) toxisch ist, während die Hepatocyten der regenerierenden Leber nach partieller Hepatektomie, die durch HU am Übertritt in die S-Phase gehindert werden, widerstandsfähiger sind (Schwartz et al.,1965; Faber und Baserga,1969; Baugnet-Mathieu et al.,1968). Diese Beobachtungen können in Verbindung mit den experimentellen Befunden,daß HU die RNA- und Proteinsynthese nicht beeinträchtigt (Sinclair,1965; Gale et al., 1964; Yabro et al.,1965b; Rosenkranz et al.,1966; Adams und Lindsay,1967; Kim et al.,1967; Pfeiffer und Tolmach,1967; Pollak und Rosenkranz,1967; Young et al.,1967; Rajewsky,1970) durch die derzeitige Vorstellungen über den Wirkungsmechanismus des Hydroxyharnstoffs weitgehend erklärt werden. Danach scheint HU die Umwandlung von Cytidylsäure zu Desoxycytidylsäure zu blockieren (Young

und Hodas,1964; Adams und Lindsay,1967; Young et al.,1967; Gale,1968; Moore,1969), wobei nach den Untersuchungen von Krakoff und Mitarbeitern (1968) der Inhibition des Enzyms B_2 des Ribonucleosid-Reduktase-Systems eine entscheidende Rolle zukommt. Da Bakterien nach Elimination von HU ihre Teilungsfähigkeit ohne erneute Proteinsynthese wieder erhalten, schließen Rosenkranz und Carr (1970), daß keine irreversible Inaktivierung der Nucleosiddiphosphat-Reduktase durch HU erfolgt sein kann. Ob der hier geschilderte Hemmechanismus ausschließlich zutrifft oder ob darüber hinaus noch andere Angriffsmöglichkeiten des HU bestehen, ist noch nicht geklärt. Möglicherweise beeinflußt HU auch direkt die DNA (Rosenkranz und Jacobs,1967; Rosenkranz et al.,1968,1969) oder noch andere, die DNA-Synthese regulierende Enzyme (Jacobs,1968; Rosenkranz und Jacobs,1967). Plageman und Erbe (1974) zeigten, daß HU die Inkorporation aller Desoxyribonucleoside in die DNA hemmt und daß es den dATP- und dGTP-Pool erschöpft, während der Einbau von Thymidin und Desoxycytidin in den dTTP- und dCTP-Pool verstärkt wird. Dabei steigert HU eher die Synthese von dTTP und dCTP, als daß es deren Umsatzgeschwindigkeit hemmt. Dies läßt die Möglichkeit offen, daß Hydroxyharnstoff noch andere Angriffspunkte als die Blockade der Desoxycytidylsäuresynthese besitzt. An die toxische Wirkung weiterer Hydroxyharnstoffmetabolite wurde ebenfalls gedacht; so entstehen in vivo unter anderem aus gealterten HU-Lösungen Isohydroxyharnstoff und N,O-Dicarbamylhydroxylamin (Rosenkranz et al.,1969).

Auch wenn die gegenwärtigen Vorstellungen über den molekularen Wirkungsmechanismus von HU noch nicht abgeschlossen sind und möglicherweise noch Änderungen erfahren, so lassen sich doch die oben beschriebenen Effekte dieser Substanz jetzt weitgehend erklären. Es scheint nun verständlich, daß HU insbesondere während der S-Phase toxisch wirkt, da unter seinem Einfluß der Nachschub an Desoxycytidin sistiert. Da in den schnell, jedoch weitgehend asynchron proliferierenden Wechselgeweben die Wahrscheinlichkeit groß ist, daß HU auf eine relativ große Anzahl an S-Phasenzellen einwirkt, erscheint die beschriebene schädigende Wirkung auf solche Zellsysteme verständlich. Eine andere Situation liegt nun in der regenerierenden Leber nach Zweidrittel-Hepatektomie vor. Wie in dem vorangegangenen Abschnitt beschrieben, beginnt die DNA-Synthese erst etwa 15-17h nach der Operation. Wird nun während der präproliferativen Phase ein HU-Block gesetzt und über einen längeren Zeitabschnitt aufrechterhalten, so werden die Zellen wegen des auf diese Weise induzierten Desoxycytidinmangels nicht in die S-Phase eintreten, sie stauen sich an der Grenze von der G_1 - zur S-Phase auf und gelangen erst nach Unterschreiten des HU-Wirkspiegels, jetzt allerdings in verstärktem Maße, in das Kompartiment DNA-synthetisierender Zellen. Dieser verstärkte Fluß in die S-Phase bedeutet aber nach dem bisher gesagten, daß eine weitere Verstärkung der Synchronisation proliferierender Zellen stattgefunden hat.

Nach den im vorangehenden Kapitel und in diesem Abschnitt besprochenen Befunden kann theoretisch erwartet

werden, daß eine HU-Infusion zu Beginn der DNA-Synthese nach Zweidrittel-Hepatektomie zu einer beträchtlichen Erhöhung des Synchronisationsgrades proliferierender Zellen führt, so daß sich unter diesen Versuchsbedingungen möglicherweise molekularbiologische Untersuchungen zur Zellproliferation durchführen lassen. In der folgenden Versuchsanordnung wird der ^3H -Thymidin-Markierungsindex im Autoradiogramm als Maß für die Synchronisation proliferierender Zellen in der regenerierenden Leber in Abhängigkeit von der Dauer der HU-Infusion und der postoperativen Regenerationszeit bestimmt. Der Markierungsindex wird getrennt für Hepatocyten, Gallengangsepithelien, im Portalfeld gelegenen Bindegewebszellen sowie die v. Kupffer'schen Sternzellen einschließlich der Sinusendothelzellen im Parenchym der Leber ausgewertet. Der zusätzlich bestimmte Mitoseindex ermöglicht Rückschlüsse auf das Fortbestehen der am $\text{G}_1\text{-S}$ -Übergang erfolgten Synchronisation während des Zellzyklus. Die Analyse der intralobulären Verteilung DNA-synthetisierender Hepatocyten sowie der Mitosen in Abhängigkeit von der HU-Infusionsdauer ergibt Aufschluss über die optimalen Proliferationsbedingungen innerhalb der Leberläppchen. Darüber hinaus wurden Kontrollversuche durchgeführt, bei denen anstelle der HU-Infusion eine Dauerapplikation einer 0,15 m NaCl-Lösung bzw. eine ^3H -TdR-Dauermarkierung angewandt wurde. Im ersten Fall wird im Vergleich mit den HU-behandelten Tieren das Ausmaß der Synchronisation deutlich, während unter den Bedingungen des zweiten Versuchs sich eine Vergleichsmöglichkeit zwischen Wachstumsfraktion der regenerierenden Leber

und Markierungsindex nach Synchronisation mit Hydroxyharnstoff ergeben.

Im Rahmen der hier geschilderten, komplexen Themenstellung bestand die Aufgabe dieser Arbeit in der Auswertung der Autoradiogramme.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1. Behandlung der Versuchstiere

Männliche Wistar AF/Han Ratter eigener Zucht von 210-230g Gewicht erhielten Wasser und Futter (Altromin^R Standarddiät) ad libitum. Die Zweidrittel-Resektion der Leber wurde nach der Methode von Higgins und Anderson (1931) in Äthernarkose durchgeführt. Noch vor dem postoperativ beginnenden Anstieg der DNA-Synthese erhielten die Tiere 14h nach der Operation eine einmalige i.v. Injektion von 0,128mg/g Körpergewicht Hydroxyharnstoff in 0,15m NaCl-Lösung. Anschließend erfolgte eine Dauerinfusion via Schwanzvene mit einer Hydroxyharnstoffkonzentration von 0,095mg/g Körpergewicht je Stunde. Die zugeführte Volumenmenge betrug 0,56ml/h. Während der Infusion war lediglich der Schwanz der Tiere fixiert, so daß Wasser und Futter nach Belieben aufgenommen werden konnte. Die Infusion begann 14h nach der Operation und dauerte 10,5h, 18h und 26h, so daß sie 24,5h, 32h und 40h nach partieller Hepatektomie beendet war. Zu verschiedenen Zeiten nach Infusionsbeendigung erhielt jeweils ein Tier eine einmalige Injektion von 0,8 μ C/g Körpergewicht Thymidin-6-³H (³H-TdR, spez. Akt. 5Ci/mM, Radiochemical Centre Amersham) je nach Körpergewicht in 0,8 bis 1,2ml Hankslösung und wurde nach 1h durch Nackenschlag getötet.

In ergänzenden Experimenten wurde diese Versuchsanordnung geringgradig abgewandelt. Eine Tiergruppe (n=4) erhielt von der 14. bis zur 36. Stunde post operationem eine Dauer-

infusion mit HU in der beschriebenen Konzentration. Nach 39-stündiger Regenerationszeit wurde eine ^3H -TdR-Pulsmarkierung durchgeführt und die Tiere nach 60 min getötet. Zwei Tieren wurde 14 - 39.6 Stunden nach Teilhepatektomie eine ^3H -TdR-Dauerinfusion angelegt; die zugeführte Radioaktivität betrug $0,2 \mu\text{Ci}/^3\text{H}$ -TdR je Stunde und g Körpergewicht. Auch diese Tiere wurden 40 h nach Teilhepatektomie durch Nackenschlag getötet. Einer 3. Tiergruppe wurde 14 h bis 36 h post operationem lediglich eine Infusion mit $0,15\text{m NaCl}$ -Lösung angelegt, auch diese Tiere erhielten nach 39-stündiger Regenerationszeit eine Pulsmarkierung mit ^3H -TdR. Diese Versuchsabwandlungen ermöglichen den Vergleich zwischen der Wachstumsfraktion der regenerierenden Leber und HU-induzierter Synchronisation DNA-synthetisierender Hepatocyten und verdeutlichen den Anstieg der Fraktion der S-Phasenzellen im Vergleich zum ^3H -TdR-Index nach einfacher Pulsmarkierung.

2. 2. Autoradiographische Technik

Von dem in 10%igem Formalin mit $0,4 \text{ mM}$ inaktivem Desoxythymidin fixierten lobulus dexter lateralis der entnommenen Lebern wurden nach Paraffineinbettung $4 - 5 \mu$ dicke Schnitte angefertigt. Nach Wässerung und 2×60 minütigem Waschen der entparaffinierten Präparate in inaktiver Desoxythymidin-Lösung ($0,4 \text{ mM}$) erfolgte die Anfertigung der Autoradiogramme nach der Dipping-Methode mit K_2 -Emulsion (Ilford). Die Expositionszeit betrug 21 Tage bei 4°C . Anschließend wurden die Schnitte mit Hämalaun-Eosin gefärbt.

2.3. Quantitative Auswertung der Autoradiogramme

Zur Bestimmung des ^3H -TdR-Markierungsindex der Parenchymzellen wurden bei 625facher Vergrößerung (Objektiv 50x, Tubusfaktor 1,25x, Großfeldokular 10x) von jeder Leber Gruppen von 5x1000 Hepatocyten ausgewertet. Dabei wurden nur Zellkerne, deren Silberkornbelegung sich deutlich von dem umgebenden Background abhob, als "markiert" angesehen. In den graphischen Abbildungen wurde der Mittelwert sowie die Streuung der einzelnen Gruppen (Kreuze) angegeben. In gleicher Weise wurden die Mitoseindices aufgetragen; dabei werteten wir nur morphologisch eindeutig fassbare Mitosefiguren (späte Prophase bis frühe Telophase) aus. Bei der Bestimmung des ^3H -TdR-Markierungsindex der Gallengangsepithelien wurden je Tier 5x100 Zellen und bei der Auswertung der Bindegewebszellen im Glisson'schen Feld 4x500 Zellen gezählt. Da sich innerhalb der Leberläppchen ^3H -TdR-markierte Sinusendothelien und v. Kupffer'sche Sternzellen nicht eindeutig unterscheiden ließen, wurden diese Zellarten zusammengefasst. Auch in diesem Falle wurden 4x500 Kerne je Leber ausgewertet und die Streuung der vier Gruppen jeweils als Kreuze in den Abbildungen aufgetragen.

Um die intralobuläre Verteilung ^3H -TdR-markierter Parenchymzellen zu erfassen, wurde mit einem Okularzählraster ebenfalls bei 625facher Vergrößerung flächengleiche Quadrate der Kantenlänge 42,6 μm in das Gesichtsfeld projiziert und von den unterschiedlich großen Leberlobuli von jedem Tier 2 Populationen von je 30 gleichlangen

Leberläppchen ausgewählt. Die Breite der analysierten Fläche betrug $127,8 \mu\text{m}$ (3 Rasterquadrate), die Länge je nach Abstand Portalfeld - Ast der Vena hepatica $383,4 \mu\text{m}$ bzw. $426,0 \mu\text{m}$ (9 bzw. 10 Rasterquadrate). Die Auswertung begann am Rande eines Astes der Vena hepatica und endete am Beginn des zugehörigen Portalfeldes. Zur besseren Übersicht wurden beide Populationen unterschiedlicher Lobuluslänge auf eine gemeinsame, in 9 bzw. 10 Zonen unterteilte Abszisse projiziert.

Bei der Bestimmung der Intralobulären Verteilung der Mitosen verfahren wir ähnlich. Von jeder Leber wurden insgesamt 200 Mitosen ausgewertet und den erwähnten intralobulären Zonen zugeordnet. Da jedoch insgesamt der Mitoseindex zu niedrig lag, um getrennte Kurvenverläufe für die beiden Populationen unterschiedlich langer Leberbälkchen angeben zu können, wurden in den graphischen Abbildungen lediglich die jeweiligen Summationskurven aufgetragen.

3. ERGEBNISSE

3. 1. Der ^3H -TdR-Markierungs- und Mitoseindex der Hepatocyten in der regenerierenden Rattenleber in Abhängigkeit von der Dauer der Hydroxyharnstoffinfusion

In der ersten Abbildung sind die ^3H -TdR-Markierungsindices in der regenerierenden Rattenleber nach partieller Hepatektomie und unterschiedlicher Infusionsdauer von Hydroxyharnstoff (HU) aufgetragen. Beginnt die HU-Infusion 14 h post operationem und wird sie nach 24,5-stündiger Regenerationszeit beendet, so finden sich zu diesem Zeitpunkt lediglich etwa 2% der Hepatocyten in der DNA-Synthesephase. Eine Stunde nach Absetzen der HU-Infusion, nach 25,5-stündiger Regenerationszeit, scheint der ^3H -TdR-Markierungsindex gegenüber dem vorhergehenden Wert noch etwas weiter abgesunken zu sein. Im folgenden vierstündigen Zeitintervall steigt er jedoch steil an; er beträgt nach einer Stunde 17,8%, nach der 2. Stunde 43,1% und erreicht nach 4 Stunden Werte von 56 %. Wie sich aus der Differenz der Markierungsindices 25,5- und 29,5 Stunden nach der Operation errechnen läßt, beträgt der Fluß vom G_1 - in das Kompartiment DNA-synthetisierender Zellen in diesem Zeitintervall $(56,7\% - 1,8\%):4\text{h}=13,7\%/h$. Nachdem die höchsten Markierungswerte erreicht sind, treten die Hepatocyten in schneller Folge wieder aus der DNA-Synthesephase heraus; nach 34,5-stündiger Regenerationszeit ist der Markierungsindex auf 15,2% abgesunken und bleibt in den folgenden 4 Stunden annähernd konstant. Der Efflux aus dem S-Kompartiment erfolgt scheinbar etwas



Abb. 1: Prozentsatz ^3H -TdR-markierter Hepatocyten nach partieller Hepatektomie bei unterschiedlich langer Hydroxyharnstoff-infusion. ^3H -TdR-Pulsmarkierung zu den angegebenen Zeitpunkten, ^3H -TdR-Verfügbarkeitszeit 60 Min.

- 10,5 -stündige HU-Infusion
- - - - 18,0 -stündige HU-Infusion
- . - . - . 26,0 -stündige HU-Infusion
- 26,0 -stündige Na Cl-Infusion

langsamer und errechnet sich zu 8,3%. Dieser Wert gibt allerdings nicht den tatsächlichen Efflux aus der DNA-Synthesephase wieder, da während der Abnahme des Markierungsindex, 29,5h bis 34,5h nach partieller Hepatektomie erneut Zellen in die DNA-Synthese eingetreten sind. Aus diesem Grunde sinkt der Prozentsatz markierter Hepatocyten nach dem DNA-Synthesepack auch nicht bis auf null ab, sondern beträgt wie oben erwähnt etwa 15,2%.

Wird nun die Dauer der HU-Infusion auf 18h verlängert, so laufen auch die Zellen, die im Zeitabschnitt 24,5h - 32h post operationem ohne HU-Applikation in die S-Phase eingetreten wären, an der G_1 -S-Phasengrenze auf und treten erst nach Beendigung des Blockes nahezu gleichzeitig in das Kompartiment DNA-synthetisierender Hepatocyten ein.

Dieses Verhalten wird bei der Betrachtung der mittleren Kurve des 3H -TdR-Markierungsindex der Abbildung 1 deutlich. Wie aus der Darstellung ersichtlich, begann in diesem Falle die HU-Infusion ebenfalls 14h post operationem, wurde jedoch erst nach 32-stündiger Regenerationszeit beendet. Unter diesen Bedingungen finden sich zu diesem Zeitpunkt nur etwa 0,4% der Zellen in der DNA-Synthesephase. Eine Stunde nach Absetzen der Infusion ist der Markierungsindex auf 0,1% abgefallen. Bei einer 18-stündigen Infusionsdauer ist der HU-induzierte Block des Flusses vom G_1 - in das S-Kompartiment praktisch vollständig. In einem nur 3-stündigen Intervall nimmt der Anteil DNA-synthetisierender Hepatocyten von 0,1% auf 74,7% zu. Unter diesen Bedingungen beträgt die Flußrate von G_1 - nach S, 24,86%/h. Das Maximum

der DNA-Synthese wird nur etwa eine Stunde lang aufrechterhalten; in den folgenden vier Stunden sinkt der $^3\text{H-TdR}$ -Markierungsindex wieder auf 6,6% ab.

Wird die HU-Infusionsdauer noch weiter ausgedehnt und von der 14. bis zur 40. Stunde nach Zweidrittel-Hepatektomie durchgeführt, so läßt sich der Prozentsatz $^3\text{H-TdR}$ -markierter Hepatocyten, wie aus dem rechten Teil der 1. Abbildung ersichtlich wird, bis auf 90,1 % erhöhen. Unter diesen Versuchsbedingungen steigen die $^3\text{H-TdR}$ -Markierungsindices in einem kurzen Zeitintervall an, um etwa ebenso schnell wieder abzusinken. Wie ein Kontrollversuch unter Dauerinfusion mit physiologischer Kochsalzlösung zeigt, beträgt der $^3\text{H-TdR}$ -Markierungsindex nach Pulsmarkierung 44 h nach partieller Hepatektomie 10,6%, während er bei gleichzeitiger HU-Infusion auf 90,1 % zunahm.

In der folgenden Darstellung (Abb. 2) sind nun bei gleicher Versuchsanordnung die Mitoseindices aufgetragen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß wegen der relativ kurzen Verfügbarkeitszeit des radioaktiven Thymidins auf der Abscisse in Abb. 1 die Zeitpunkte der $^3\text{H-TdR}$ -Applikation angezeigt wurden, während in Abb. 2 bei den Mitosekurven die Tötungszeitpunkte angegeben wurden. Der Vergleich beider Darstellungen zeigt deutlich, daß die Werte der Mitoseindices gegenüber den $^3\text{H-TdR}$ -Markierungsindices etwa um den Faktor 10 niedriger liegen. Nachdem die Hepatocyten die S-Phase beendet haben, findet sich beim Durchlauf der G_2 -Phase und beim Eintritt in die Mitosephase bereits eine weitgehende Desynchronisation. Trotzdem scheint der Mitoseindex mit zunehmender Infusionsdauer anzusteigen. Während

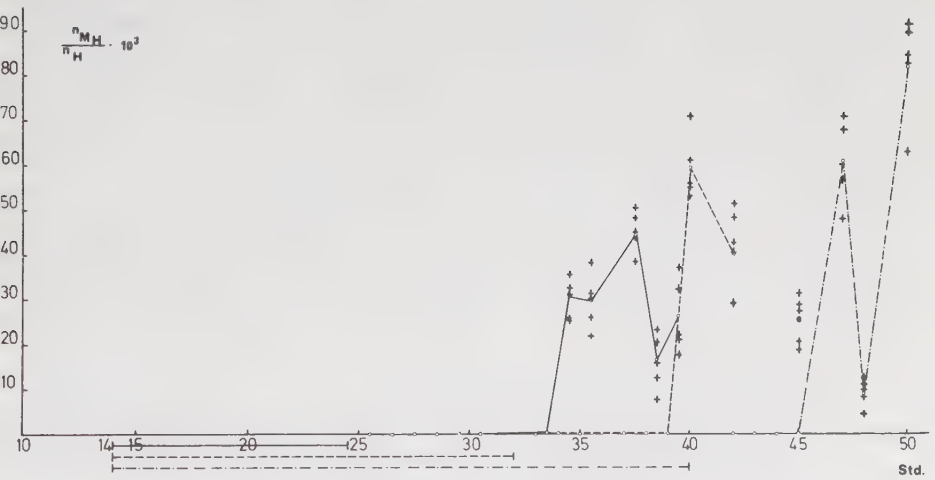


Abb. 2: Mitoseindex der Hepatocyten (o/oo) nach partieller Hepatektomie bei unterschiedlich langer Hydroxyharnstoffinfusion, Tötungszeit zu den angegebenen Zeitpunkten.

- 10,5 -stündige HU-Infusion
- - - 18,0 -stündige HU-Infusion
- . - . - . 26,0 -stündige HU-Infusion
- 26,0 -stündige NaCl-Infusion

das Maximum der DNA-Synthese bei 10,5-stündiger HU-Infusion 29,5 h nach partieller Hepatektomie, bei 56,7% liegt (Abb. 1), tritt das Mitosemaximum bei gleichen Versuchsbedingungen mit einer zeitlichen Verzögerung von etwa 8 Stunden auf und erreicht Werte von etwa 45 o/oo nach 37,5-stündiger Regenerationszeit. Diese zeitliche Verzögerung verkürzt sich nach 18-stündiger HU-Infusionsdauer auf etwa 4 - 5 Stunden. Der im Vergleich zur DNA-Synthese weitgehend asynchrone Eintritt der Hepatocyten in die Mitosephase wird besonders deutlich, wenn der Mitoseindex eines Kontrollversuchs nach NaCl-Dauerinfusion betrachtet wird. Unter diesen Bedingungen beträgt er nach 44-stündiger Regenerationszeit 25 o/oo; demgegenüber führt eine 26-stündige HU-Infusionsdauer 14 h - 40 h post operationem nur zu einer Steigerung auf maximal etwa 28 o/oo (Abb. 2).

3. 2. Der ^3H -TdR-Markierungsindex der nicht parenchymatösen Zellen in der regenerierenden Rattenleber in Abhängigkeit von der Dauer der Hydroxyharnstoffinfusion

Wird das Verhalten der ^3H -TdR-Markierungsindices der Hepatocyten (Abb. 1) unter den gleichen Versuchsbedingungen mit dem Prozentsatz DNA-synthetisierender Gallengangsepithelien (Abb. 3) verglichen, so ergeben sich einige interessante Beobachtungen. Der Vergleich der beiden Darstellungen zeigt, daß der Synchronisationsgrad proliferierender Gallengangsepithelien nach Hydroxyharnstoffinfusion gegenüber den Hepatocyten wesentlich geringer ist. Dieses Verhalten kommt einmal darin zum Ausdruck,

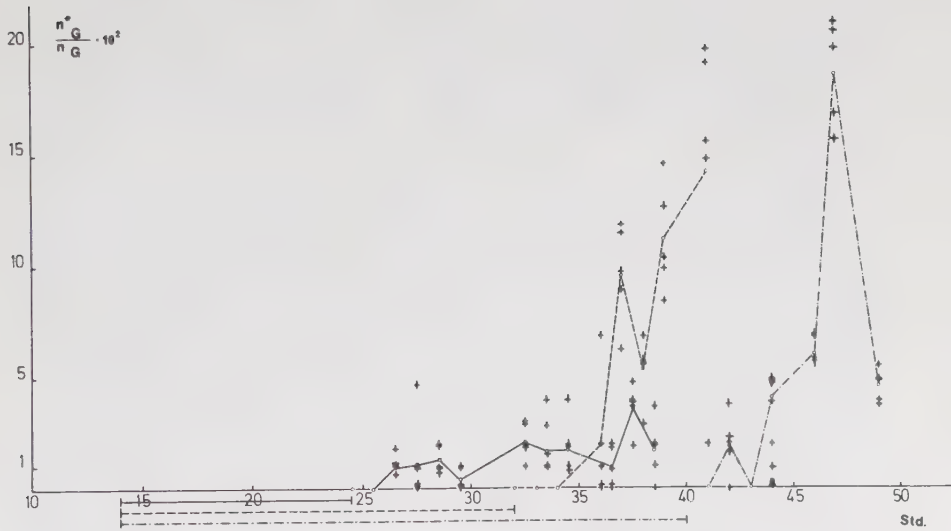


Abb. 3: Prozentsatz ^3H -TdR-markierter Gallengangszellen nach partieller Hepatektomie bei unterschiedlich langer Hydroxyharnstoffinfusion. ^3H -TdR-Pulsmarkierung zu den angegebenen Zeitpunkten, ^3H -TdR-Verfügbarkeitszeit 60 Min.

- 10,5 -stündige HU-Infusion
- 18,0 -stündige HU-Infusion
- . - . - . - . 26,0 -stündige HU-Infusion
- 26,0 -stündige NaCl-Infusion

daß die ^3H -TdR-Markierungsindices der Cholangiocyten wesentlich niedriger sind als die der Leberepithelien, zum anderen steigt die Anzahl markierter Gallengangszellen insgesamt langsamer an. Bei einer 10,5h andauernden HU-Infusion finden sich 24,5 h und 25,5 h post operationem noch keine DNA-synthetisierenden Gallengangszellen. In den folgenden Stunden beträgt der Markierungsindex etwa 1-2%, erst nach 37,5 -stündiger Regenerationszeit wird ein kleiner Gipfel DNA-synthetisierender Cholangiocyten von etwa 3,6 % erreicht (linke Kurve der Abb. 3). Interessant scheint, daß dieser Gipfel gegenüber dem Maximum DNA-synthetisierender Hepatocyten mit einer zeitlichen Verzögerung von 8 Stunden auftritt. Bei einer 18-stündigen HU-Infusionsdauer sind ebenfalls nach Beendigung des Blockes 3 Stunden lang noch keine markierten Gallengangsepithelien anzutreffen (mittlere Kurve der Abb. 3); danach steigt der ^3H -TdR-Markierungsindex auf etwa 14,5 % nach 41-stündiger Regenerationszeit an. Auch in diesem Falle werden die höchsten DNA-Synthesewerte gegenüber dem ^3H -TdR-Markierungsindex der Hepatocyten mit einer zeitlichen Verzögerung von mindestens 5 Stunden gefunden. Dieses Intervall verkürzt sich nach 26-stündiger HU-Infusionszeit auf etwa 3 Stunden (rechte Kurve der Abb. 3). Auch bei den Gallengangsepithelien führt eine Verlängerung der HU-Infusionszeit zu einer Verstärkung des Synchronisationsgrades (Abb. 3). Der Anstieg des ^3H -TdR-Markierungsindex verläuft zunehmend steiler, und der DNA-Synthesepic bildet sich deutlicher heraus.

Die DNA-synthetisierenden Bindegewebszellen im Portalfeld (Abb. 4) verhalten sich ähnlich wie die eben besprochenen Cholangiocyten (Abb. 3). Auch die Bindegewebszellen werden durch HU nicht in dem Ausmaß synchronisiert, wie das bei den Hepatocyten (Abb. 1) zutrifft. Auch bei den Fibrocyten steigt mit zunehmender HU-Infusionsdauer der Synchronisationsgrad an. Erwähnenswert scheint, daß die DNA-Synthesemaxima der Bindegewebszellen im Glisson'schen Feld in zeitlicher Übereinstimmung mit denen der Gallengangsepithelien auftreten.

Wenn man das Verhalten aller nicht parenchymatösen Zellen innerhalb des eigentlichen Leberparenchyms (Abb. 5) untersucht und mit den bereits dargestellten Befunden vergleicht, so fällt auf, daß der Synchronisationsgrad proliferierender Zellen nach HU-Infusion gegenüber den Gallengangsepithelien (Abb. 3) und den Fibrocyten im Portalfeld (Abb. 4) deutlich erhöht ist, die Werte der Hepatocyten (Abb. 1) jedoch nicht erreicht.

Unter den hier durchgeführten Versuchsbedingungen treten die DNA-Synthesemaxima der Hepatocyten (Abb. 1) und der nicht parenchymatösen Zellen im Leberparenchym (Abb. 5) in zeitlicher Übereinstimmung auf, während die der Gallengangszellen (Abb. 3) und die der im Portalfeld gelegenen Fibrocyten demgegenüber mit geringer zeitlicher Verzögerung erreicht werden. Auch bei den interparenchymatös gelegenen Sinusuferzellen steigt der Synchronisationsgrad DNA-synthetisierender Zellen mit zunehmender Dauer der HU-Infusion an.

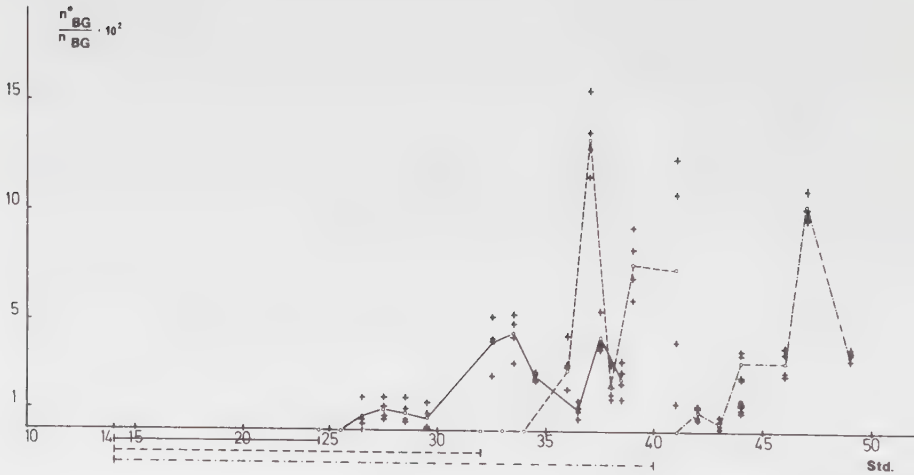


Abb. 4: Prozentsatz ^3H -TdR-markierter Bindegewebszellen im Portalfeld nach partieller Hepatektomie bei unterschiedlich langer Hydroxyharnstoffinfusion. ^3H -TdR-Pulsmarkierung zu den angegebenen Zeitpunkten, ^3H -TdR-Verfügbarkeitszeit 60 Min.

- 10,5 -stündige HU-Infusion
- 18,0 -stündige HU-Infusion
- . - . - . - . - 26,0 -stündige HU-Infusion
- 26,0 -stündige Na Cl-Infusion

3.3. Die intralobuläre Verteilung ^3H -TdR-markierter Hepatocyten sowie der Mitosen in der regenerierenden Rattenleber in Abhängigkeit von der Dauer der Hydroxyharnstoff-infusion

Um die intralobuläre Verteilung DNA-synthetisierender Hepatocyten bei unterschiedlichen Durchschnittswerten der ^3H -TdR-Markierungsindices (Abb. 1) zu analysieren, wurden einige charakteristische Beispiele ausgewählt. Die Abbildungen 6 bis 9 geben die Ergebnisse wieder. Die ersten beiden Darstellungen zeigen die Topik ^3H -TdR-markierter Hepatocyten nach 10,5-stündiger HU-Infusion und entsprechen einem durchschnittlichen Markierungsindex von 17,8 % nach 26,5-stündiger (Abb. 6) bzw. 56,7 % nach 29,5-stündiger Regenerationszeit (Abb. 7), 2h bzw. 5h nach Beendigung der HU-Infusion. Wie die Abbildung 6 zeigt, findet sich das Maximum ^3H -TdR-markierter Hepatocyten in peripher gelegenen Zonen der Leberacini; hier sind etwa 40 % der Hepatocyten in der DNA-Synthesephase. Unmittelbar periportal nimmt jedoch der Anteil DNA-synthetisierender Leberzellen auf etwa 25 % ab. Die intralobuläre Zone des DNA-Synthesemaximums grenzt nicht unmittelbar an das Portalfeld an. In Richtung auf den perivenösen Abschnitt des Leberläppchens nimmt der ^3H -TdR-Markierungsindex von den am dichtesten markierten Läppchenarealen nahezu kontinuierlich ab. Nach weiterer dreistündiger Regenerationszeit, während des Maximums ^3H -TdR-markierter Leberzellen nach 10,5-stündiger HU-Infusion, 29,5 h nach partieller Hepatektomie (vergl. Abb. 1

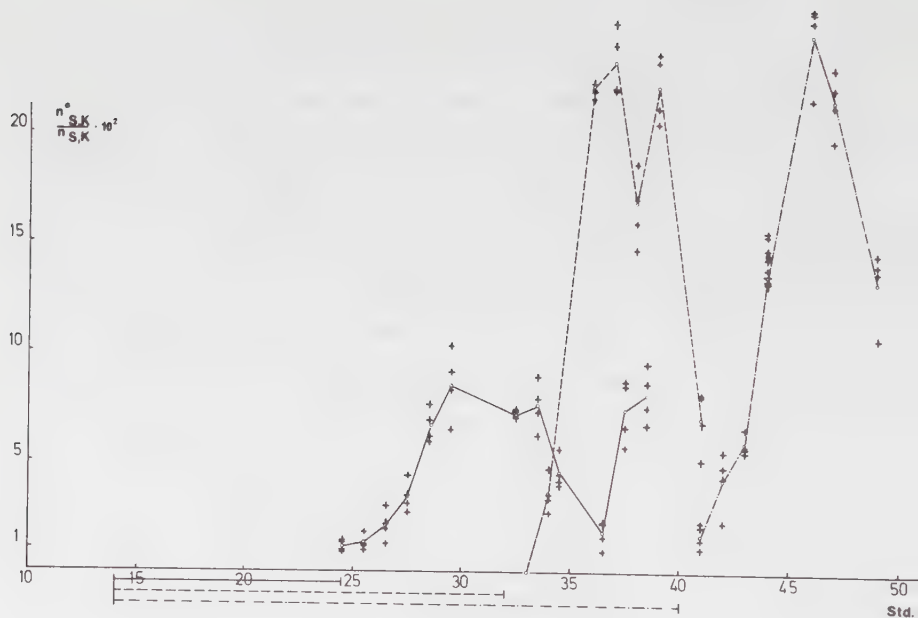


Abb. 5: Prozentsatz ^3H -TdR-markierter Sinusuferzellen und v. Kupffer'sche Sternzellen innerhalb des Leberacinus nach partieller Hepatektomie bei unterschiedlich langer Hydroxyharnstoffinfusion, ^3H -TdR-Pulsmarkierung zu den angegebenen Zeitpunkten, ^3H -TdR-Verfügbarkeitszeit 60 Min.

- 10,5 -stündige HU-Infusion
- 18,0 -stündige HU-Infusion
- .-.-.-.- 26,0 -stündige HU-Infusion
- 26,0 -stündige Na Cl-Infusion.

linke Kurve) hat die Markierungsdichte innerhalb der Acini zwar stark zugenommen (Abb. 7), das Verteilungsmuster DNA-synthetisierender Hepatocyten hat sich jedoch nicht grundlegend geändert. In der Zone dichtester Markierung befinden sich etwa 80 % der Leberzellen in der S-Phase, im Vergleich zur vorhergehenden Darstellung (Abb. 6) hat sich die Zone stärkster DNA-Synthese verbreitert, so daß der Abfall des ^3H -TdR-Markierungsindex in Richtung auf die perivenösen Lobulusareale steiler erfolgt. Auch hier reicht die Zone dichtester Markierung nicht unmittelbar an das Portalfeld heran; hier sinkt der Anteil DNA-synthetisierender Zellen auf etwa 55 % ab; drei Stunden früher (Abb. 6) lag er jedoch in diesem Läppchenabschnitt lediglich bei 25 %.

Die beiden folgenden Darstellungen (Abb. 8 und 9) geben die intralobuläre Lokalisation der S-Phasenzellen nach 26-stündiger HU-Infusion und nach 41- bzw. 44-stündiger Regenerationszeit wieder; die entsprechenden durchschnittlichen ^3H -TdR-Markierungsindices betrugen 50,4% bzw. 90,1% (vergl. Abb. 1, rechte Kurve). Auch in diesen Beispielen zeigt sich im Prinzip das bereits geschilderte intralobuläre Verteilungsmuster DNA-synthetisierender Hepatocyten. In den unmittelbar periportal gelegenen Lobuluszonen ist der ^3H -TdR-Markierungsindex im Vergleich zu den intermediären Läppchenarealen erniedrigt. Von den Zonen höchster Markierungsdichte nimmt der Anteil der S-Phasenzellen in Richtung auf den venösen Schenkel des Leberacinus wiederum stark ab. Interessant

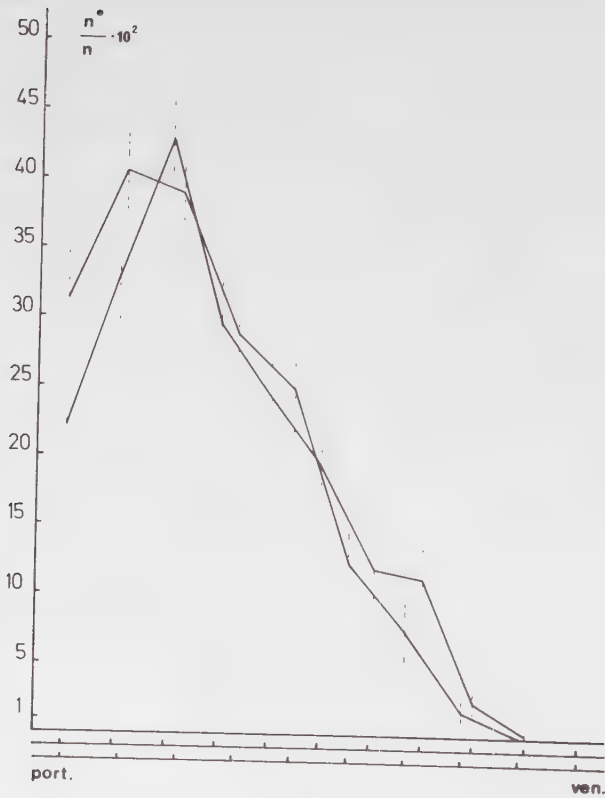


Abb. 6: Intralobuläre Verteilung ^3H -TdR-markierter Hepato-
cyten 26,5h nach Zweidrittel-Hepatektomie; Hydroxyharnstoff-
infusion 14h - 24,5h post op., Auswertung von jeweils zwei
Lobuluspopulationen mit den Abständen Portalfeld (port.) -
Ast der V. hepatica (ven.) von 383,4 μm bzw. 426 μm
(9 bzw. 10 Rasterquadrate). Mittelwerte und Abweichung
des mittleren Fehlers vom Mittelwert.

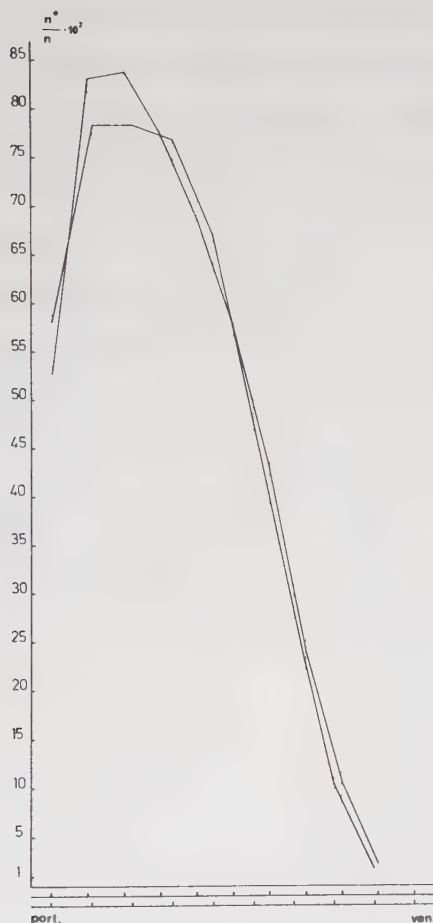


Abb. 7: Intralobuläre Verteilung ^3H -TdR-markierter Hepato-
cyten 29,5h nach Zweidrittel-Hepatektomie; Hydroxyharnstoff-
infusion 14h - 24,5h post op., Auswertung von jeweils zwei
Lobuluspopulationen mit den Abständen Portalfeld (port.) -
Ast der V. hepatica (ven.) von 383,4 μm bzw. 426 μm
(9 bzw. 10 Rasterquadrate). Mittelwerte und Abweichung des
mittleren Fehlers vom Mittelwert.

erscheint der Vergleich zwischen den intralobulären Verteilungsmustern DNA-synthetisierender Hepatocyten während des jeweils höchsten Markierungsindex nach 10,5- bzw. 26-stündiger HU-Infusionsdauer. Die durchschnittlichen ^3H -TdR-Markierungsindices betrugen zu diesem Zeitpunkt 56,7 bzw. 90,1% (vergl. Abb. 1). Wie der Vergleich der Abbildungen 7 und 9 ergibt, verbreitern sich die intermediären intralobulären Läppchenzonen höchster ^3H -TdR-Markierungsdichte, so daß der Abfall DNA-synthetisierender Hepatocyten in Richtung auf die perivenösen Lobuluszonen wieder steiler erfolgt (Abb. 9). Unmittelbar periportal nimmt der Prozentsatz markierter Leberzellen zu. Die Zunahme der durchschnittlichen Markierungsindices (Abb. 1) beruht also teilweise auf einer Verbreiterung der intralobulären Läppchenzonen optimaler Proliferationsbedingungen.

Wie aus der 2. Abbildung zu entnehmen ist, erfolgt der Eintritt der Hepatocyten in die Mitosephase im Vergleich zur DNA-Synthese wieder weitgehend asynchron. Während der G_2 -Phase ist die HU-induzierte Synchronisation DNA-synthetisierender Hepatocyten in der regenerierenden Rattenleber nach partieller Hepatektomie wieder zum großen Teil verloren gegangen. Der Mitoseindex ist jedoch im Vergleich zur regenerierenden Leber ohne HU-Infusion noch deutlich erhöht, so daß die intralobuläre Verteilung der Mitosen analysiert werden kann. Wiederum wurden hierzu einige Kurvenpunkte der Abb. 2 ausgewählt, bei denen die Untersuchung der intralobulären Mitoseverteilung sinnvoll erscheint. Die Anzahl der Zellen in der M-Phase war jedoch insgesamt zu niedrig, um je nach

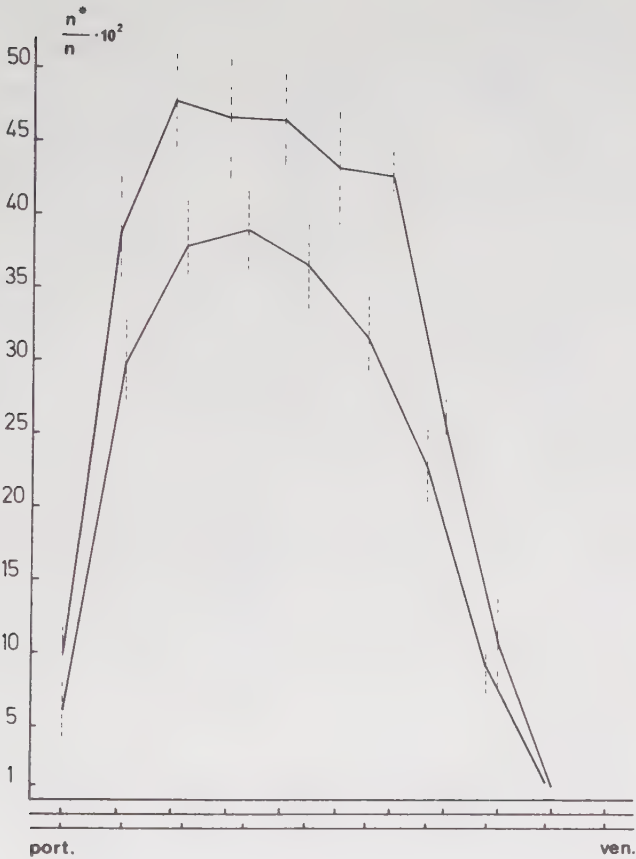


Abb. 8: Intralobuläre Verteilung ^3H -TdR-markierter Hepatocyten 41 h nach Zweidrittel-Hepatektomie; Hydroxyharnstoff-infusion 14h - 40h post op., Auswertung von jeweils zwei Lobuluspopulationen mit den Abständen Portalfeld (port.) - Ast der V. hepatica (ven.) von 383,4 μm bzw. 426 μm (9 bzw. 10 Rasterquadrate). Mittelwerte und Abweichung des mittleren Fehlers vom Mittelwert.

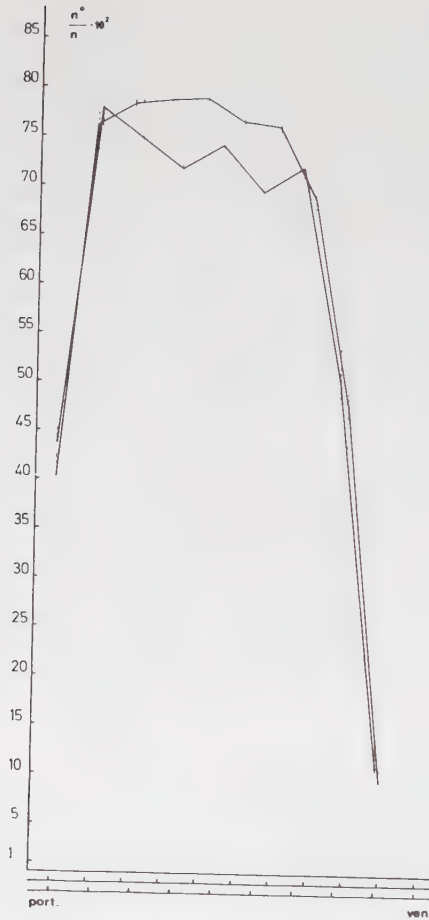


Abb. 9: Intralobuläre Verteilung ^3H -TdR-markierter Hepato-
cyten 44 h nach Zweidrittel-Hepatektomie; Hydroxyharnstoff-
infusion 14h - 40h post op., Auswertung von jeweils zwei
Lobuluspopulationen mit den Abständen Portalfeld (port.) -
Ast der V. hepatica (ven.) von 383,4 μm bzw. 426 μm
(9 bzw. 10 Rasterquadrate). Mittelwerte und Abweichung des
mittleren Fehlers vom Mittelwert.

Lobuluslänge getrennte Kurvenverläufe darstellen zu können. Deshalb geben die folgenden Abbildungen die graphische Kurvenaddition jeweils zweier unterschiedlich langer Bälkchenpopulationen wieder. Nach 18-stündiger HU-Infusion, 40 bzw. 42 h nach der Zweidrittel-Hepatektomie, lagen die mittleren Mitoseindices bei etwa 60 o/oo bzw. 40 o/oo (Abb. 2, mittlere Kurve). Die intralobuläre Verteilung der Mitosefiguren (Abb. 10 und 11) entspricht im wesentlichen derjenigen DNA-synthetisierender Hepatocyten. Periportal finden sich nur wenige Mitosen, der Index liegt in intermediären Läppchenzonen am höchsten und nimmt wiederum in den perivenösen Arealen ab. Nach 26-stündiger HU-Infusion, 47 bzw. 50 h post operationem, betrugen die mittleren Mitoseindices etwa 60 o/oo bzw. 82 o/oo (Abb. 2, rechte Kurve). Die intralobuläre Verteilung entspricht auch hier etwa der Lokalisation DNA-synthetisierender Leberzellen. Wie jedoch bereits erwähnt, ist das intralobuläre Verteilungsmuster der Mitosen jedoch nur grob erfaßbar, da die Mitoseindices für eine derartige, statistisch exakte Analyse zu niedrig waren.

3. 4. Vergleich zwischen Wachstumsfraktion und Hydroxyharnstoff-induzierter Synchronisation DNA-synthetisierender Hepatocyten in der regenerierenden Rattenleber

In einer ergänzenden, in seiner Durchführung gegenüber der bisher beschriebenen, gering abgewandelten Versuchsanordnung soll die HU-induzierte Synchronisation DNA-synthetisierender

Hepatocyten in der regenerierenden Rattenleber nach partieller Hepatektomie der nach ^3H -Thymidin-Dauerinfusion bestimmten Wachstumsfraktion gegenübergestellt werden. In den bisher beschriebenen Experimenten wurde eine ^3H -TdR-Pulsmarkierung durchgeführt. Unter diesen Bedingungen inkorporieren den Prekursor diejenigen Zellen, die sich zum Zeitpunkt der ^3H -TdR- Applikation in der DNA-Synthese befanden. Wird nun über einen längeren Zeitraum ^3H -TdR als Dauerinfusion verabreicht, so werden sämtliche Zellen, die während der ^3H -TdR-Applikation in die S-Phase gelangen, markiert. Nach Beendigung der DNA-Synthese treten sie in die G_2 -Phase des Zellzyklus ein und bilden nach der Mitose zwei Zellen, auf die sich das inkorporierte ^3H -TdR verteilt.

Bei solch einem vergleichenden Experiment wurde einer Tiergruppe von der 16. bis zur 36. Stunde post operationem HU in der beschriebenen Konzentration infundiert; nach weiteren 3h, also 39h nach der Zweidrittelresektion, wurde eine ^3H -TdR-Pulsmarkierung durchgeführt und die Tiere nach weiteren 60 Minuten getötet. Die Kontrollgruppe bestand aus zwei Tieren; sie erhielten 14h bis 39,6h nach der Operation eine ^3H -TdR-Infusion und wurden ebenfalls nach 40-stündiger Regenerationszeit getötet. Einer 3. Gruppe wurde 14h bis 36h post operationem lediglich eine Infusion 0,15m NaCl-Lösung angelegt, auch diese Tiere wurden nach 39-stündiger Regenerationszeit mit ^3H -TdR markiert und nach einer weiteren Stunde getötet.

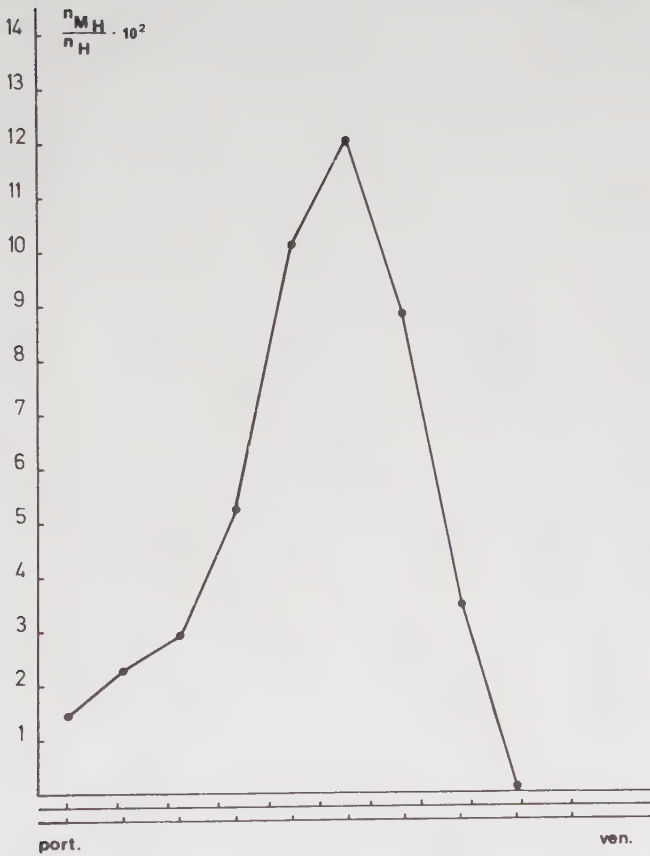


Abb. 10: Intralobuläre Verteilung der Mitosen 40 h nach Zweidrittel-Hepatektomie; Hydroxyharnstoffinfusion 14 h - 32 h post op., Summationskurven von jeweils zwei Lobuluspopulationen mit den Abständen Portalfeld (port.) - Ast der V. hepatica (ven.) von 383,4 μm bzw. 426 μm (9 bzw. 10 Rasterquadrate).

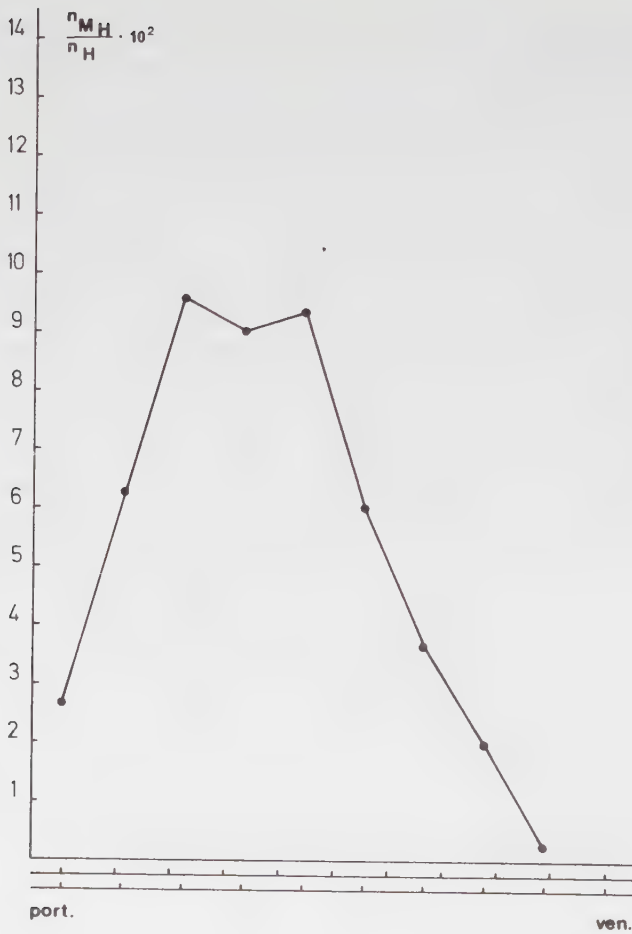


Abb. 11: Intralobuläre Verteilung der Mitosen 42 h nach Zweidrittel-Hepatektomie; Hydroxyharnstoffinfusion 14 h - 32 h post op., Summationskurven von jeweils zwei Lobuluspopulationen mit den Abständen Portalfeld (port.) - Ast der V. hepatica (ven.) von 383,4 μ m bzw. 426 μ m (9 bzw. 10 Rasterquadrate).

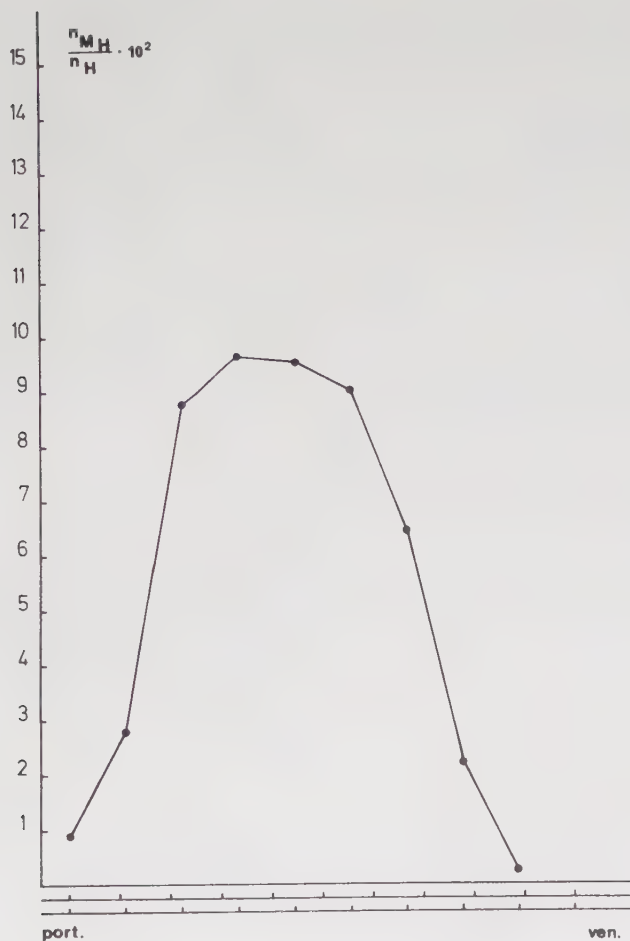


Abb. 12: Intralobuläre Verteilung der Mitosen 47 h nach Zweidrittel-Hepatektomie; Hydroxyharnstoffinfusion 14 h - 40 h post op., Summationskurve von jeweils zwei Lobuluspopulationen mit den Abständen Portalfeld (port.) - Ast der V. hepatica (ven.) von 383,4 μm bzw. 426 μm (9 bzw. 10 Rasterquadrate).

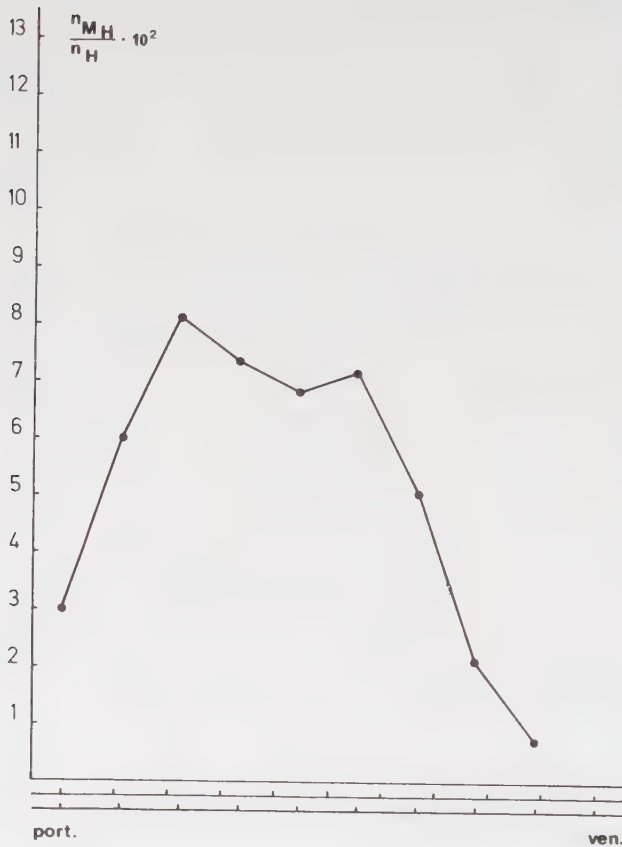


Abb. 13: Intralobuläre Verteilung der Mitosen 50 h nach Zweidrittel-Hepatektomie; Hydroxyharnstoffinfusion 14 h - 40 h post op., Summationskurve von jeweils zwei Lobuluspopulationen mit den Abständen Portalfeld (port.) - Ast der V. hepatica (ven.) von 383,4 μ m bzw. 426 μ m (9 bzw. 10 Rasterquadrate).

Die Ergebnisse sind in den beiden folgenden Abbildungen dargestellt. Der ^3H -TdR-Markierungsindex nach ^3H -Thymidin-Dauerinfusion beträgt 53,6%. Wie aus der Abbildung 14 zu ersehen ist, stimmt das intralobuläre Verteilungsmuster DNA-synthetisierender Hepatocyten mit den bereits beschriebenen Ergebnissen überein. Die Zonen höchster Markierungsdichte, in denen bis 80% aller Hepatocyten ^3H -TdR inkorporiert haben, liegen intermediär; periportal sowie in den perivenösen Läppchenzonen nimmt die Markierungsdichte ab.

Bei den Hydroxyharnstoff-infundierten Tieren, bei denen nach Beendigung des so induzierten DNA-Syntheseblocks eine ^3H -TdR-Pulsmarkierung durchgeführt wurde, liegt der durchschnittliche Markierungsindex mit 58,9% etwas höher. Die intralobuläre Verteilung (Abb. 15) markierter Hepatocyten stimmt in beiden Versuchsgruppen auffallend überein. Um das Ausmaß der HU-induzierten Synchronisation DNA-synthetisierender Leberzellen nach partieller Hepatektomie zu demonstrieren, wurde zusätzlich in der letzten Abbildung die intralobuläre Verteilung markierter Hepatocyten 40 h nach der Operation bei einer Tiergruppe aufgetragen, die als Kontrolle eine Infusion mit physiologischer Kochsalzlösung erhielt. Unter diesen Bedingungen werden wiederum nur diejenigen Zellen erfaßt, die sich zum Zeitpunkt der ^3H -TdR-Injektion in der S-Phase befanden, Hepatocyten, die bereits wieder die S-Phase verlassen haben, nehmen ^3H -TdR nicht auf.

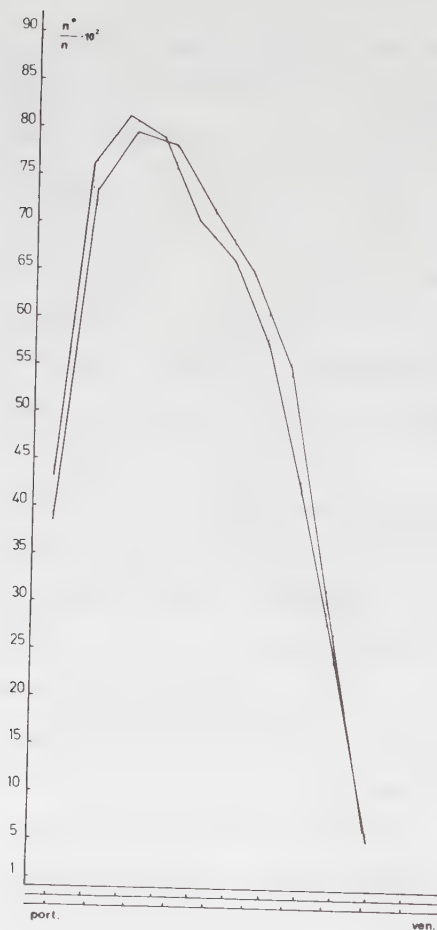


Abb. 14: Intralobuläre Verteilung ^3H -TdR-markierter Hepato-
cyten 40 h nach Zweidrittel-Hepatektomie; ^3H -Thymidininfusion
14 h - 39,6 h post op., Auswertung von jeweils zwei Lobulus-
populationen mit den Abständen Portalfeld (port.) - Ast der
V. hepatica (ven.) von 383,4 μm bzw. 426 μm (9 bzw. 10 Ras-
terquadrate). Mittelwerte und Abweichung des mittleren Fehlers
vom Mittelwert.

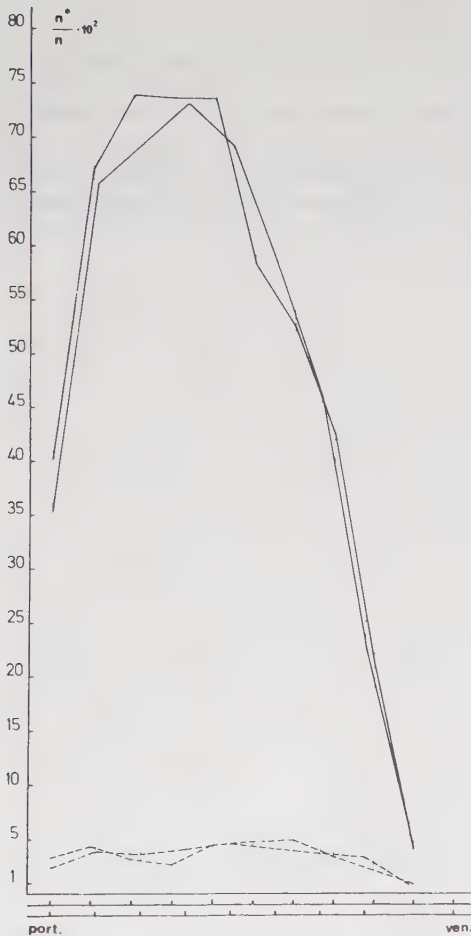


Abb. 15: Intralobuläre Verteilung ^3H -TdR-markierter Hepatocyten 40h nach Zweidrittel-Hepatektomie; Hydroxyharnstoff-infusion 14h - 36h post op., ^3H -TdR-Pulsmarkierung 39h post op. Intralobuläre Verteilung ^3H -TdR-markierter Hepatocyten 40 h nach Zweidrittel-Hepatektomie; NaCl-Infusion 14h - 36h post op., ^3H -TdR-Pulsmarkierung 39h post op. Auswertung von jeweils zwei Lobuluspopulationen mit den Abständen Portalfeld (port.) - Ast der V. hepatica (ven.) von 383,4 μm bzw. 426 μm (9 bzw. 10 Rasterquadrate). Mittelwerte und Abweichung des mittleren Fehlers vom Mittelwert.

Diese Zellen werden jedoch durch eine einmalige ^3H -TdR-Applikation markiert, wenn sie durch Hydroxyharnstoff am Eintritt in die S-Phase gehindert wurden und nach Aufheben des Blocks nahezu simultan in das S-Kompartiment eintreten.

4. DISKUSSION.

4.1. Zum Verhalten der ^3H -TdR- und Mitoseindices in der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoffinfusion

Durch einen temporären Hydroxyharnstoff- (HU) Block, der die Zellen an dem Eintritt in die DNA-Synthesephase hindert, gelingt es am Modell der regenerierenden Rattenleber nach Zweidrittel-Hepatektomie, die proliferierenden Hepatocyten zu synchronisieren, so daß sich ein großer Anteil der untersuchten Zellpopulation gleichzeitig in der DNA-Synthesephase befindet. In Abhängigkeit von der Dauer des HU-Blocks werden die normalerweise während der Regeneration in die S-Phase eintretenden Zellen an der G_1 -S-Grenze arretiert und gelangen nach Beendigung des Blockes nahezu gleichzeitig in das Kompartiment DNA-synthetisierender Hepatocyten. In der hier beschriebenen Versuchsanordnung waren unter optimalen Bedingungen etwa 90 % der Hepatocyten gleichzeitig in der S-Phase (Abb. 1).

Eine ideale Synchronisation wäre dann erreicht, wenn die Flußraten der Zellen in das S-Kompartiment, beziehungsweise aus der S-Phase, unendlich groß wären. Unter diesen, allerdings nur theoretisch denkbaren Bedingungen wären die graphischen Darstellungen der Abbildung 1 so verändert, daß der ^3H -TdR-Markierungsindex sofort 100 % betrüge und dieser Wert für die Dauer der DNA-Synthesephase konstant bliebe, um dann ebenso unvermittelt auf den Nullwert abzusinken.

Solche Idealbedingungen sind jedoch in biologischen Systemen nicht erreichbar. Diese Überlegungen zeigen jedoch die Bedeutung der Änderung des ^3H -TdR-Markierungsindex je Zeiteinheit und damit die der Flußrate in das S-Kompartiment für den Synchronisationsgrad. Wie in den Ergebnissen dargestellt (mittlere Kurve der Abb. 1), betrug die Flußrate bei den hier vorliegenden Versuchsbedingungen etwa 25%/h. Die Größe der Flußrate und damit auch der Synchronisationsgrad hängt nun wesentlich von den pharmakokinetischen Eigenschaften des Hydroxymarnstoffs ab. Es erscheint verständlich, daß die biologische Halbwertszeit von Hydroxyharnstoff maximal gleich der Flußrate der Zellen in das S-Phasenkompartiment sein kann. Aus der Steilheit des Anstiegs des ^3H -TdR-Markierungsindex kann eine indirekte Aussage über diesen pharmakokinetischen Parameter gemacht werden. Betrachtet man zum Beispiel die mittlere Kurve der Abbildung 1, so zeigt sich, daß eine Stunde nach Beendigung der HU-Infusion der ^3H -TdR-Markierungsindex noch nahezu gleich null ist. Nach weiteren drei Stunden (180 Minuten) hat er seinen höchsten Wert von etwa 75% erreicht, bereits nach etwa 1,5 Stunden beträgt er etwa 44 %. Hieraus kann geschlossen werden, daß die Zeit bis zur Unterschreitung der kritischen Hemmkonzentration des HU kürzer als 90 Min. sein muß. Im Plasma un behandelter Ratten beträgt sie 15 Minuten (Wilson et. al., 1975) bzw. 35 Min. (Philips et al., 1967). Nach 2/3-Resektion der Leber wurde ein Anstieg der Halbwertszeit von 23 Min. auf 61 Min. beschrieben (Fabricius und Rajewsky,

1971). Bei den hier vorliegenden Versuchsbedingungen haben Rabes und Mitarbeiter (1977) nun tatsächlich im Serum eine biologische Halbwertszeit des HU von 80 Min. gefunden. Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Halbwertszeit in der Leber selbst kürzer ist als im Blutplasma (Fabricius und Rajewsky, 1971).

Für ideale Synchronisationsbedingungen, die wie erwähnt nur theoretisch denkbar sind, wäre eine unendlich kleine biologische Halbwertszeit des synchronisierenden Agens Voraussetzung, das bedeutet für die hier beschriebene Versuchsanordnung, daß Hydroxyharnstoff nach Beendigung des Blockes sofort aus dem Lebergewebe entfernt werden müßte. In vivo lassen sich solche Bedingungen jedoch nicht erfüllen.

Aus dem Verhalten der ^3H -TdR-Markierungsindices in der Abb. 1 läßt sich die Dauer der DNA-Synthesephase, t_s , abschätzen. Wenn man berücksichtigt, daß während des Anstiegs des Markierungsindex alle ^3H -TdR-markierte Zellen für die Zeit t_s in der DNA-Synthesephase verbleiben, so gibt die parallel zur Abscisse gezogene Linie zwischen dem halbmaximalen ^3H -TdR-Markierungsindex und dem abfallenden Kurvenschenkel ein Maß für die Dauer der DNA-Synthesephase. Für die linke Kurve der Abb. 1, bei der die HU-Infusion nach 24,5-stündiger Regenerationszeit beendet wurde, ergibt sich so ein Wert für die S-Phasendauer von etwa 7 Stunden, während sie für die Versuchsbedingungen, deren Ergebnisse in der mittleren Kurve dar-

gestellt sind, nur etwa 4,5 Stunden ergeben. In der regenerierenden Rattenleber ohne HU-Applikation wurde die Dauer der DNA-Synthesephase zu 7,5 - 8,5 h bestimmt (Looney, 1960; Looney et al., 1960; Edwards und Koch, 1964; Fabrikant, 1968; Stöcker, 1966; Rabes et al., 1972). Interessant erscheint nun, daß Hydroxyharnstoff sowohl in vitro (Sinclair, 1965; Pfeiffer und Tolmach, 1967) als auch in vivo (Rajewsky, 1970; Dethlefsen und Riley, 1973) die DNA-Synthesedauer verkürzt. Diese Tendenz ergibt sich auch aus den in der Abb. 1 dargestellten Kurvenverläufen, danach scheint die S-Phasendauer mit fortschreitender HU-Infusionszeit weiter abzunehmen. Man muß jedoch betonen, daß die Abschätzung der S-Phasendauer aus dem Kurvenverlauf nur einen ungefähren Richtwert ergibt und keinesfalls einer genauen Messung gleichkommt. Diese Feststellung gilt insbesondere deswegen, weil die Meßergebnisse insgesamt auf einer kleinen Tierzahl beruhen. Dieses hatte seinen Grund einmal darin, weil die - in ihrer Durchführung relativ aufwendigen Experimente - am Anfang weiterer Untersuchungen standen, zum anderen zeigte sich nach Auswertung der Ergebnisse, daß durch den erreichten hohen Synchronisationsgrad DNA-synthetisierender Zellen die untersuchten Lebern weitgehend gleichgeschaltet wurden, so daß auf eine hohe Versuchstierzahl zur Sicherung der gewonnenen Ergebnisse verzichtet werden konnte.

Die Werte der Mitoseindices (Abb. 2) lagen erstaunlich niedrig. Diese Beobachtung dürfte im wesentlichen in zwei Gründen ihre Ursache haben. Einmal könnte der zeit-

liche Untersuchungsabstand im Verhältnis zur Dauer der Mitosephase zu groß gewesen sein, so daß möglicherweise höhere Mitoseindices nicht erfaßt wurden. Da die Mitosedauer, t_M , in der regenerierenden Leber etwa 45 Min. bis 60 Min. beträgt (Brues und Marble, 1937; Cater et al., 1956; Edwards et al., 1972), die Untersuchungsintervalle bei der hier beschriebenen Versuchsanordnung jedoch bis zwei Stunden betrugen, erscheint diese Erklärung durchaus sinnvoll. Eine weitere Möglichkeit, die den niedrigen Mitoseindex erklärt, besteht darin, daß der Eintritt der Zellen in die Mitosephase nach Beendigung der DNA-Synthese und der G_2 -Phase des Zellzyklus wieder weitgehend asynchron erfolgt. Da nach den Untersuchungen von Wirsching (1974) sowie von Rabes und Mitarbeitern (1975, 1976) bekannt ist, daß die minimale G_2 -Phasendauer je nach Lokalisation der Hepatocyten im Leberacinus zwischen 2,8 und 4,5 Stunden schwankt und die maximale Mitosendauer Werte zwischen 1,49 h und 3,18 h annimmt, scheint ein schnell einsetzender Verlust der HU-induzierten Synchronisation der DNA-Synthese wahrscheinlich.

Unter Berücksichtigung der gemachten Einschränkungen folgt der Mitosepeak (Abb.2) nach 10,5-stündiger HU-Infusionsdauer mit einer Verzögerung von etwa 8 h dem DNA-Synthesemaximum. Dieser Wert entspricht den Beobachtungen in der regenerierenden Leber ohne HU-Behandlung (Grisham, 1962; Stöcker, 1966; Fabrikant, 1968; Tuózek et al., 1975). Nach 18-stündiger HU-Infusionsdauer verkürzt sich dieses Inter-

vall auf 4-5 h (vergl. Abb.1 und 2). Möglicherweise verkürzt die längere HU-Infusion nicht nur die S-Phasendauer sondern auch die G₂-Phase.

4.2. Zur Zeitdifferenz zwischen ³H-TdR-Markierungsindices der Hepatocyten und der nicht parenchymatösen Zellen in der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoffinfusion

Über die Beziehung zwischen dem proliferativen Verhalten unterschiedlicher Zellarten in der regenerierenden Leber ist wenig bekannt, insbesondere gibt es keine Untersuchungen, die mögliche kausale Zusammenhänge zwischen der Proliferation der Hepatocyten und der nicht parenchymatösen Zellen belegen. In der regenerierenden Rattenleber nach Zweidrittel-Hepatektomie erreichen nach den Untersuchungen von Gris-ham (1962) die Gallengangsepithelien erst nach einer zeitlichen Verzögerung von etwa 16 h gegenüber den Hepatocyten ihr DNA-Synthesemaximum. Nach einem langsamen, 24 h dauernden Anstieg nimmt die Kurve des ³H-TdR-Markierungsindex der Gallengangszellen eher eine plateauförmige Gestalt an. Wid-man und Fahimi (1975) fanden die höchsten Mitoseindices der Peroxydase-positiven von Kupffer'schen Sternzellen zwei Tage nach Zweidrittel-Resektion der Rattenleber; die Anzahl der Mitosen nahm dann bis zum 5. Tage post operationem verhältnismäßig schnell ab, war jedoch nach 8 und 11 Tagen noch gering erhöht. Demgegenüber wurde das Maximum der Peroxydase-

negativen Endothelzellen erst am 4. postoperativen Tag erreicht, auch hier fiel der Mitoseindex langsam ab. Aus diesen Befunden könnte man nun den vorsichtigen Schluß ziehen, daß - falls überhaupt ein kausaler Zusammenhang zwischen der Proliferation der unterschiedlichen Zellarten in der Leber besteht - möglicherweise die Proliferation der Parenchymzellen Voraussetzung für den Eintritt der nicht parenchymatösen Zellen in die DNA-Synthesephase ist und nicht umgekehrt. Andererseits können die nicht parenchymatösen Zellen auch unabhängig von den Hepatocyten proliferieren: so zeigt sich, daß nach Östradiol-Stimulation (Kelly und Dobson, 1971) oder während der immunologischen Reaktion nach Infektion mit *Listeria monocytogenes* (North, 1969) die Phagocyten der Leber sinusoidale proliferieren.

Aus den hier vorgelegten Versuchsergebnissen geht nun hervor, daß in der HU-synchronisierten regenerierenden Rattenleber die Cholangiocyten und Bindegewebszellen im Glisson'schen Feld etwa gleichzeitig in die DNA-Synthese eintreten; die Fibrocyten scheinen dabei tendenzmäßig eher etwas früher als die Gallengangszellen die DNA-Synthese zu beginnen. Verglichen mit den Hepatocyten gelangen jedoch beide Zellarten mit zeitlicher Verzögerung in die S-Phase. Diese zeitliche Differenz verkürzt sich jedoch mit zunehmender HU-Applikationsdauer auf 3-4 h. Demgegenüber treten die Sinusuferzellen und von Kupffer'schen Sternzellen im Leberparenchym nahezu gleichzeitig mit den Hepatocyten in die DNA-Synthese ein. Ein kausaler Zusammenhang zwischen der DNA-Synthese der He-

patocyten und dem Eintritt der nicht parenchymatösen Zellen in die S-Phase läßt sich somit weitgehend ausschließen. Die Verzögerung des DNA-Synthesebeginns der im Portalfeld gelegenen Zellarten läßt sich möglicherweise auf andere Diffusionsbedingungen zurückführen, die auch ein langsames Absinken der HU-Hemmkonzentrationen bewirken könnten. Es ist anzunehmen, daß sich nach Absetzen des HU innerhalb des Lobulus von portal nach perivenös ein Gradient der HU-Konzentration im Serum einstellt, da HU vorwiegend in der Leber metabolisiert wird (Colvin und Bono, 1970).

4.3. Zur intralobulären Verteilung der ^3H -TdR- und Mitoseindices der Hepatocyten in der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoffinfusion

Die intralobuläre Verteilung DNA-synthetisierender Hepatocyten erfolgt in der regenerierenden Rattenleber nach partieller Hepatektomie nach einem zeitlich genau definierten Muster (Rabes und Tuczek, 1971, Tuczek, 1970; Tuczek und Rabes, 1973 b; Rabes et al., 1975, 1976). Danach finden sich 20 h nach partieller Resektion etwa 25 % der Hepatocyten der periportal Zonen des Leberläppchens in der DNA-Synthesephase; von hier aus fällt der Markierungsindex in Richtung auf den venösen Schenkel des Leberläppchens nahezu kontinuierlich ab. Die unmittelbar periportal gelegenen Hepatocyten weisen zu diesem Zeitpunkt einen etwas niedrigeren ^3H -TdR-Markierungsindex auf. Wie aus der Analyse der intralobulären Verteilung DNA-synthe-

tisierender Hepatocyten 18 h und 19 h nach partieller Hepatektomie hervorgeht, entsteht dieses charakteristische Verteilungsmuster durch eine unterschiedliche Zunahme der Markierungsdichte in unterschiedlich für den G_1 -S-Übertritt prädisponierten Läppchenarealen. Mit fortschreitender Regenerationszeit werden auch die mehr perivenös gelegenen Hepatocyten in die DNA-Synthese einbezogen, während die periportal gelegenen Hepatocyten die S-Phase bereits wieder verlassen. Auf diese Weise entsteht für jeden postoperativen Untersuchungszeitpunkt ein charakteristisches Verteilungsmuster DNA-synthetisierender Zellen. Dieses Verhalten zeigt Parallelen zum Rappaport'schen Konzept der Einteilung des Leberazinus in differente Zonen (Rappaport et al., 1954, Rappaport, 1960, 1963, 1976). Die unmittelbar paraportal gelegene Zone reduzierter Markierungsdichte entspricht dabei der Zone II; die perivenösen Läppchenareale träger Zellproliferation der unter weniger günstigen nutritiven Bedingungen stehenden Zone III, während die Zone I mit dem Bezirk besonders intensiver DNA-Synthese übereinstimmt. Wie aus den Abbildungen 6 bis 9 und 10 bis 13 hervorgeht, gilt das eben Gesagte prinzipiell auch für die intralobuläre Verteilung DNA-synthetisierender und mitotischer Hepatocyten nach partieller Hepatektomie und zusätzlicher Synchronisation der Zellproliferation durch Hydroxyharnstoff. Die periportal, jedoch nicht unmittelbar paraportal gelegenen Läppchenareale bieten die besten Bedingungen für den Eintritt in die DNA-Synthese. Mit fortschreitender Regenerationszeit bzw. länger dauernder HU-Applikation treten zunehmend auch die perivenös ge-

liegenden Hepatocyten in die S-Phase ein. Die intralobulären Zonen stärkster DNA-Synthese korrespondieren mit denjenigen maximaler mitotischer Aktivität. Bei der Betrachtung der intralobulären Verteilung der Mitosen ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Dauer der Mitosephase (t_M) - im Gegensatz zur DNA-Synthesedauer - in den perivenösen Läppchenarealen ansteigt; sie beträgt hier etwa 3,17 h, in dem unmittelbar periportal gelegenen Areal 2,25 h und reduziert sich in den Zonen optimaler Proliferationsbedingungen auf etwa 1,5 h (Rabes et al., 1975). Da mit verlängerter Mitosephase die Wahrscheinlichkeit zunimmt, daß die Mitosefigur bei der Auswertung angetroffen wird, folgt, daß bei der Analyse des intralobulären Verteilungsmusters die Mitosen in den perivenösen Läppchenarealen überbewertet werden.

Die Frage, warum die einzelnen intralobulären Läppchenzonen so unterschiedliche Bedingungen für die Zellproliferation bieten, läßt sich noch nicht eindeutig beantworten. In den letzten Jahren wurden jedoch zahlreiche mit morphologischen, histochemischen, autoradiographischen, in letzter Zeit auch biochemischen Methoden fassbare intralobuläre Unterschiede der Hepatocyten gefunden, die teilweise das heterogene Verhalten proliferierender Parenchymzellen erklären. Die mitochondrialen Enzyme der Atmungskette wie die Cytochromoxydase (Burstone, 1959; Novikoff und Essner, 1960) oder die eng mit der oxydativen Phosphorylierung verbundenen Enzyme des Citratcyclus wie die Succinatdehydrogenase (Schumacher, 1957; Novikoff und Essner, 1960; Nolte und Pette, 1972) sind vorwiegend

in den periportalen Läppchenarealen lokalisiert, während die Isocitratdehydrogenase und Lipoyldehydrogenase (Diaphorase), welche die ersten Schritte des Tricarbonsäurecyclus katalysieren, vorwiegend perivenös anzutreffen sind (Wachstein, 1959; Schumacher, 1957; Pette und Brandau, 1966). Sie könnten zur Anreicherung von Succinyl-Coenzym A führen, einem Vorläufer der d-Aminolävulinsäure, dem Grundbaustein der Porphyrine und Zellhämine. Entsprechend der heterogenen Verteilung der mitochondrialen Enzyme finden sich auch morphologische Unterschiede zwischen periportal und perivenös gelegenen Mitochondrien: die Mitochondrien der perivenös gelegenen Hepatocyten sind zahlreicher, kleiner und nehmen einen geringeren Teil des Zellvolumens ein als in den intermediär und periportal gelegenen Parenchymzellen (Loud, 1968; Reith et al., 1968). Die Enzyme des Glykogen- und Glucosestoffwechsels wie die Phosphorylase und UDP Glukose: glycogen α -4-Glucosyltransferase (Sasse, 1969; Sasse und Köhler, 1969) sowie die Glucose-6-Phosphatase (Novikoff und Essner, 1960; Wachstein, 1959) sind ebenfalls lobuloperipher anzutreffen. Neuere Untersuchungen zeigten, daß die Aktivität der Phosphoenol-pyruvat-Carboxykinase in den periportal Lobulusarealen etwa dreimal so hoch wie in den perivenösen Zonen ist, während die Pyruvatkinase wiederum etwa zweimal aktiver in den perivenösen Läppchenarealen war (Guder und Schmidt, 1976). Demnach scheint die Glukoneogenese in den periportal Zellen zu überwiegen, während die Glykolyse im perivenösen Schenkel des Leberläppchens offenbar aktiver ist. Interessant erscheint, daß die Glucose-6-Phosphatdehydro-

genase, die über den Pentosephosphatcyclus die Ribose für die Nukleinsäuresynthese liefert, wiederum in den perivenösen Läppchenzonen verstärkt nachgewiesen wird (Isselbacher und Jones, 1964).

Die Inkorporation von ^3H -Leucin im Autoradiogramm als Maß für den Aminosäurestoffwechsel erfolgt nach kurzen Verfügbarkeitszeiten wiederum vorwiegend periportal (Le Bouton, 1969; Le Bouton, 1971). Dementsprechend findet sich auch hier die für die Transaminierung von Aminosäuren wichtige Glutamat-Pyruvat-Transaminase (Shank et al., 1959) sowie die Ornithin-Carbamyl-Transferase (Mizutani, 1968), ein Enzym, das die Startreaktion für den Harnstoffcyclus katalysiert. Enzyme der oxydativen Aminosäuresdesaminierung wie die Glutaminsäuredehydrogenase (Shank et al., 1959; Novikoff und Esser, 1960; Pette und Brandau, 1966) werden dagegen wiederum vorwiegend in den perivenösen Lobulusabschnitten gefunden. Dieses trifft auch für Enzyme des Fettstoffwechsels wie die Lipase (Klein et al., 1952; Eger, 1961) oder die β -Hydroxybutyratdehydrogenase zu (Novikoff und Esser, 1960), die freie Acetessigsäure zu β -Hydroxybutyrat, einem Ketonkörper, reduziert. Auch die Entgiftungsreaktion der Leber weist offenbar intralobuläre Unterschiede auf, so finden sich die Alkoholdehydrogenase (Greenberger et al., 1965) und die β -Glucuronidase (Hayashi, 1964) periportal, während das glatte endoplasmatische Retikulum als Ort der Biotransformation wiederum besonders in den perivenösen Zonen ausgebildet ist (Loud, 1968; Reith et al., 1968). Die Hepatocyten eines Leberläppchens weisen also je nach ih-

rer intralobulären Lokalisation eine starke funktionelle Heterogenität auf. Dabei entsprechen die Zonen stärkster Proliferationsaktivität den intralobulären Arealen optimaler Energieversorgung; erst mit fortschreitender Regeneration werden auch die mehr perivenös gelegenen Hepatocyten, deren Funktion offenbar mehr in der Aufrechterhaltung des Intermediärstoffwechsels liegt, verstärkt in die Proliferation einbezogen. Interessanterweise sind die intralobulären Unterschiede in der Enzymausstattung der einzelnen Hepatocyten keine unabänderlichen Merkmale; sie können sich nach den bisherigen Untersuchungen unter Bedingungen wie Hunger oder verschiedenen Stimuli verlagern und ermöglichen so eine dynamische Anpassungsreaktion der Leber an unterschiedlichste Bedingungen.

Eingangs wurde die Forderung nach einem weitgehend synchron proliferierenden Zellsystem erhoben, das sich für die Untersuchung von Wachstumsvorgängen mit biochemischen Methoden eignet. Wie die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, befinden sich in der regenerierenden Rattenleber nach Zweidrittel-Resektion und temporärer Blockade der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff unter den hier angewandten experimentellen Bedingungen bis 90% der Hepatocyten gleichzeitig in der DNA-Synthesephase. Trotz der eben dargestellten funktionellen Heterogenität der Hepatocyten, die sich je nach ihrer Lokalisation im Leberacinus in einer unterschiedlichen Enzymausstattung manifestiert, gelingt es durch geeignete Eingriffe eine weitgehend synchrone

DNA-Synthese zu induzieren. Dabei zeigt sich durch die Analyse der intralobulären Verteilung der S-Phasenzellen und Mitosen, daß hier eine gute Übereinstimmung mit der Zellkinetik der regenerierenden Rattenleber ohne zusätzliche Applikation von Hydroxyharnstoff vorliegt. Die zusätzliche Applikation von HU gestattet es, die Leberregeneration in zeitlich geraffter Form ablaufen zu lassen und ergibt so ein annähernd physiologisches System synchron proliferierender Hepatocyten. Solche Systeme sind eine unabdingbare Voraussetzung, weitere molekularbiologische Fragestellungen zur Zellproliferation mit biochemischen Methoden angehen zu können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Für molekularbiologische Untersuchungen von Wachstums-
vorgängen, ebenso wie für die zytostatische Tumorthherapie
ist es notwendig, daß sich ein möglichst großer Anteil der
untersuchten, beziehungsweise therapeutisch angegangenen
Zellpopulationen gleichzeitig in einer bestimmten Zell-
zyklusphase, z. B. in der DNA-Synthesephase oder Mitose
befindet. Proliferierende Zellsysteme besitzen natürlicher-
weise meist einen zu geringen Synchronisationsgrad, um mole-
kularbiologische Untersuchungen zur Zellteilung bzw. ihrer
Vorbereitung durchführen zu können. In vitro läßt sich die
Synchronisation der verschiedenen Zellzyklusphasen durch
relativ einfache experimentelle Eingriffe verstärken bzw.
induzieren. Es wurde jedoch hier versucht, an einem in vivo-
Modell - wie es die regenerierende Rattenleber nach Zwei-
drittel-Hepatektomie darstellt - den Synchronisationsgrad
proliferierender Zellen durch eine Blockade mit Hydroxyharn-
stoff (HU) am Übergang von der G_1 - zur S-Phase des Zellzyklus
zu verstärken. Nach den bisherigen Vorstellungen scheint HU
durch Hemmung der Ribonucleosiddiphosphatreduktase die DNA-
Synthese zu blockieren.

In der hier vorgelegten Untersuchung wird nach Pulsmarkierung
mit ^3H -Thymidin (^3H -TdR) der Markierungsindex im Autoradio-
gramm als Maß für die Synchronisation proliferierender Zel-
len in der regenerierenden Leber in Abhängigkeit von der

Dauer der HU-Infusion und der postoperativen Regenerationszeit bestimmt. Der ^3H -TdR-Markierungsindex wird getrennt für Hepatocyten, Gallengangsepithelien, im Portalfeld gelegenen Bindegewebszellen sowie die v. Kupffer'sche Sternzellen einschließlich der Sinusendothelien im Leberparenchym ausgewertet. Der zusätzlich bestimmte Mitoseindex ermöglicht Rückschlüsse auf das Fortbestehen der am G_1 -S-Übergang erfolgten Synchronisation während des Zellzyklus. Die Analyse der intralobulären Verteilung DNA-synthetisierender Hepatocyten und der Mitosen in Abhängigkeit von der HU-Infusionsdauer ergibt Aufschluß über die Zonen optimaler Proliferationsbedingungen innerhalb der Leberläppchen. Wird 14h bis 24,5h post operationem HU (0,095 mg/g KG und Stunde) infundiert, so beginnt der ^3H -TdR-Markierungsindex der Hepatocyten nach Pulsmarkierung (^3H -TdR-Verfügbarkeitszeit 60 min) 2 h nach Beendigung der HU-Infusion steil anzusteigen und erreicht nach 4 Stunden Werte von 56 %. Wird die HU-Infusionsdauer verlängert (14 - 32h post operationem), so steigt der ^3H -TdR-Markierungsindex in einem dreistündigen Intervall auf 74,7% an. Während dieser Zeit beträgt die Flußrate der Zellen vom G_1 - in das S-Kompartiment des Zellzyklus 24,86%/h. Verlängert man die HU-Infusionsdauer von der 14. bis zur 40. Stunde, so läßt sich der Anteil DNA-synthetisierender Hepatocyten nach ^3H -TdR-Pulsmarkierung bñs auf 90,1 % erhöhen. Die Werte der Mitoseindices liegen etwa um den Faktor 10 niedriger. Während der G_2 -Phase findet bereits

wieder eine weitgehende Desynchronisation statt. Unter den gleichen Versuchsbedingungen ist auch der Synchronisationsgrad ^3H -TdR-markierter Gallengangsepithelien, Bindegewebszellen im Portalfeld sowie v. Kupffer'scher Sternzellen und Sinusendothelien im Leberparenchym im Vergleich zu den Werten ohne zusätzliche HU-Infusion deutlich erhöht, erreicht jedoch den hohen Anteil gleichzeitig DNA-synthetisierender Hepatocyten bei weitem nicht. Die Maxima der DNA-Synthese stimmen bei Hepatocyten und nicht parenchymatösen Zellen im Leberparenchym zeitlich überein, während die der Gallengangsepithelien und Bindegewebszellen im Portalfeld demgegenüber mit zeitlicher Verzögerung auftreten. Diese Ergebnisse werden diskutiert und mit der Zellkinetik der regenerierenden Leber ohne zusätzliche Applikation von HU verglichen.

Wird die intralobuläre Verteilung DNA-synthetisierender Hepatocyten durch Unterteilung der Strecke zwischen Portalfeld und einem Ast der V. hepatica in 9 bzw. 10 flächengleiche Zonen analysiert, so zeigt sich, daß die lobuloperipheren Läppchenareale die besten Bedingungen für den Eintritt in die S-Phase bieten. Von den Zonen höchster ^3H -TdR-Markierungsdichte fällt der Markierungsindex in Richtung auf die perivenösen Läppchenzonen ab; er ist auch unmittelbar periportal erniedrigt. Bei einer länger dauernden HU-Infusion verbreitern sich die Zonen höchster Markierungsdichte, so daß der Abfall des ^3H -TdR-

Markierungsindex in Richtung auf den perivenösen Schenkel des Leberläppchens steiler erfolgt.

Die intralobuläre Verteilung der Mitosen ist prinzipiell gleichartig.

Das charakteristische Verteilungsmuster DNA-synthetisierender Hepatocyten innerhalb der Leberläppchen wird mit bereits bekannten intralobulären Differenzen, insbesondere in ihrer Enzymausstattung, verglichen.

Die zusätzliche Applikation von IUU ermöglicht es, die Leberregeneration zeitlich gerafft ablaufen zu lassen und ergibt auf diese Weise ein annähernd physiologisches System weitgehend synchron proliferierender Hepatocyten. Solche Zellsysteme sind eine Voraussetzung für die Beantwortung weiterer molekularbiologischer Fragestellungen zur Zellproliferation.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMS, R. L. P., and J. G. LINDSAY: Hydroxyurea: Reversal of inhibition and use as a synchronizing agent. *J. Biol. Chem.* 242, 1314 - 1317 (1967).
- ALTMANN, H.-W.: Der Zellersatz insbesondere an den parenchymatösen Organen. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 50, 15 - 51 (1966).
- BACHETTI, S., and G. F. WHITMORE: The action of hydroxyurea on mouse L-cells. *Cell Tissue Kinet.* 2, 193 - 211 (1969).
- BAUGNET-MATHIEU, L., R. GOUTIER, and C. BAES: Differential response of mitochondrial and nuclear DNA synthesis to hydroxyurea in normal and regenerating rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 20, 141 - 149 (1971).
- BELTZ, R. E.: Comparison of the effects of x-radiation on the elevation of thymidine kinase and thymidylate synthetase during liver regeneration. *Biochem. biophys. Res. commun.* 2, 78 - 83 (1962).
- BHUYAN, B. K., T. J. FRASER, L. G. GRAY, S. L. KUENTZEL, and G. L. NEIL: Cell-kill kinetics of several S-phase-specific drugs. *Cancer Res.* 33, 888 - 894 (1973).
- BINKERD, P.: DNA-nuclear membrane complexes in synchronized HeLa cells. *Physiol. Chemistry and Physics* 6, 245 - 260 (1974).
- BLUMENFELD, C. M.: Periodic and rhythmic activity in the kidney of the albino rat. *Anat. Rec.* 72, 435 - 443 (1938).

- BOHNE, F., R. J. HAAS, T. M. FLIEDNER, and I. FACHE: The role of slowly proliferating cells in rat bone marrow during regeneration following hydroxyurea. *Brit. J. Haematol.* 19, 533 (1970).
- BOLLUM, F. J., and V. R. POTTER: Nucleic acid metabolism in regenerating rat liver. VI. Soluble enzymes which convert thymidine to thymidine phosphates and DNA. *Cancer Res.* 19, 561 - 566 (1959).
- BRÄNDLE, H.: Untersuchungen zur Leberregeneration in hypophysectomierten Ratten. *Diss. München* 1966.
- BRUES, A. M., and B. B. MARBLE: An analysis of mitosis in liver restoration. *J. exp. Med.* 65, 15 - 27 (1937).
- BUGHER, N. L. R., J. F. SCOTT, and J. C. AUB: Regeneration of liver in parabiotic rats. *Cancer Res.* 11, 457 - 465 (1951).
- BUGHER, N. L. R., and M. N. SWAFFIELD: The rate of incorporation of labeled thymidine into the deoxyribonucleic acid of regenerating rat liver in relation to the amount of liver excised. *Cancer Res.* 24, 1611 - 1625 (1964).
- BURSTONE, M. S.: New histochemical techniques for the demonstration of tissue oxidase (cytochrome oxidase). *J. Histochem. Cytochem.* 7, 112 - 122 (1959).
- CANTRELL, E., and E. BRESNICK: Benzpyrene hydroxylase activity in isolated parenchymal and non parenchymal cells of rat liver. *J. Cell Biol.* 52, 316 - 321 (1972).
- CATER, D. B., B. E. HOLMES, and MEE, L. K.: Cell division and nucleic acid synthesis in the regenerating liver of the rat. *Acta. Radiol.* 46, 656 - 667 (1956).

- COLVIN, M., and V. H. BONO: The enzymatic reduction of hydroxyures to urea by mouse liver. *Cancer Res.* 30, 1516 - 1519 (1970).
- COOPER, Z. K., and H. C. FRANKLIN: Mitotic rhythm in epidermis of the mouse. *Anat. Rec.* 78, 1 (1940).
- COOPER, Z. K., and A. SCHIFF: Mitotic rhythm in human epidermis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 39, 323 (1938).
- DALEN, H., R. OFTERBRO, and A. ENLESET: The effect of methotrexate and sencovirin on cell division in Chang cells. *Cancer* 18, 41 - 48 (1965).
- DAOUST, R.: In: Liver function (R. W. Brauer, ed), Publ. no 4,3 Washington, D. C.: Amer. Inst. Biol. Sci. (1958).
- DETHLEFSEN, L. A., and A. M. RILEY: Hydroxyurea effects in the C_3H mouse. I. Duodenal crypt cell kinetics. *Cell Tissue Kinet.* 6, 3 16 (1973).
- DRESLER, W. F. C., and R. STEIN: Über den Hydroxyharnstoff. *Justus Liebigs Ann. Chem. Pharmacol.* 150, 242-252 (1869).
- EDER, M.: Zellerneuerung im Magen-Darm-Trakt. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 50, 75 - 90 (1966).
- EDER, M., R. JOSTEN und H. WRBA: Autoradiographische Untersuchungen zur Topik der Leberregeneration nach Teilhepatektomie und akuter Thioacetamid-Vergiftung. *Naturwissenschaften* 52, 211 - 212 (1965).
- EDWARDS, J. L., and A. KOCH: Parenchymal and littoral cell proliferation during liver regeneration. *Lab. Invest.* 13, 32 - 43 (1964).

EGER, W.: Zur struktur und Funktion des Lebergewebes.

Ärztl. Sammelblätter 50, 1 - 15 (1961).

FABER, E., and R. BASERGA: Differential effects of hydroxy-urea on survival of proliferating cells in vivo. Cancer Res. 29, 136 - 139 (1969).

FABRICIUS, E., and M. F. RAJEWSKY: Determination of hydroxy-urea in mammalian tissues and blood. Rev. Europeene Études Clin. Biol. 16, 679 - 683 (1971).

FABRIKANT, J. I.: The effect of prior continuous irradiation on the G₂, M and S phases of proliferating parenchymal cells in regenerating liver. Radiat. Res. 31, 304 (1967).

FABRIKANT, J. I.: The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver. J. Cell Biol. 36, 551 - 565 (1968).

FABRIKANT, J. I.: Size of proliferating pools in regenerating liver. Exp. Cell Res. 55, 277 - 279 (1969).

FRIEDRICH-FRESKA, H. und F. G. ZAKI: Spezifische Mitoseauslösung in normaler Rattenleber durch Serum von partiell hepatektomierten Ratten. Z. Naturforschung 96, 394 - 397 (1954).

FUJIOKA, M., M. KOGA, and J. LIEBERMAN: Metabolism of ribonucleic acid after partial hepatectomy. J. Biol. Chem. 238, 3401 - 3406 (1963).

GALE, G. R.: Effect of hydroxyurea on the incorporation of thymidine into Ehrlich Ascites Tumor cells. Biochem. Pharmacol. 13, 1377 - 1382 (1964).

GALE, G. R.: Antagonism by deoxyribosides of the inhibitory action of certain hydroxamic acids on deoxyribonucleic acid synthesis. Experientia 24, 57 (1968).

GALE, G. R., S. M. KENDALL, H. H. McLAIN, and S. DUBOIS:
Effect of hydroxyurea on *Pseudomonas Aeruginosa*. *Cancer Res.* 24, 1012 - 1017 (1964).

GERBER, G. B. und J. REMY-DEFRAIGNE: Synthese der Desoxy-
ribonucleinsäure in der isolierten perfundierten Ratten-
leber. *Z. Naturforschung* 18 b, 216 - 218 (1963).

GIUDICE, G., and G. D. NOVELLI: Effect of Actinomycin D
on the synthesis of DNA polymerase in hepatectomized rats.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 383 - 387 (1963).

GREENBERGER, N. J., R. B. COHEN, and K. J. ISSELBACHER:
The effect of chronic ethanol administration on liver
alcohol dehydrogenase activity in the rat. *Lab. Invest.*
14, 264 - 271 (1965).

GRISHAM, J. W.: A morphologic study of deoxyribonucleic
acid synthesis and cell proliferation in regenerating
rat liver, autoradiography with thymidine- H^3 . *Cancer Res.* 22, 842 - 849 (1962).

GRISHAM, J. W.: Cellular proliferation in the liver.
In: Normal and malignant cell growth. R. J. M. Fry,
M. L. Griem, W. H. Kirsten, Eds. New York: Springer
Verlag, 1969.

GUDER, W., and U. SCHMIDT: Liver cell heterogeneity. The
distribution of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate
carboxyl kinase (GPT) in the liver lobule of fed and
starved rats. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 237,
1793 - 1800 (1976).

HALBERG, F.: Young NH-mice for the study of mitosis in
intact liver. *Experientia (Basel)* 13, 502 - 503 (1957).

- HARKNESS, R. D.: The spatial distribution of dividing cells of the rat after partial hepatectomy. J. Physiol. 116, 373 - 379 (1952).
- HARKNESS, R. D.: Regeneration of the liver. Brit. med. Bull. 13, 87 - 93 (1957).
- HAYASHI, M.: Distribution of β -glucuronidase activity in rat tissue employing the Naphthol AS-Biglucuronide hexazonium pararosanilin method. J. Histochem. Cytochem. 12, 659 - 669 (1964).
- HECHT, L. J., and van R. POTTER: Nucleic acid metabolism in regenerating rat liver. The rate of DNA synthesis in vivo. Cancer Res. 16, 988 - 993 (1956).
- HECHT, L. J., and van R. POTTER: Nucleic acid metabolism in regenerating rat liver. V. Comparison of results in vivo and in tissue slices. Cancer Res. 18, 186 - 192 (1958).
- HEMINGWAY, J. T., and D. B. CATER: Effects of pituitary hormones and cortisone upon liver regeneration in the hypophysectomized rat. Nature 181, 1065 - 1066 (1958).
- HIGGINS, S. M., and R. M. ANDERSON: Experimental pathology of the liver restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. Arch. Pathol. 12, 186 - 202 (1931).
- HOFFMAN, J., and J. POST: Effects of nitrogen mustard, methotrexate and hydrocortisone on cell replication in rat ileum and spleen. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 140, 444 - 448 (1972).
- HOFFMAN, J., and J. POST: The effects of antitumor drugs on the cell cycle. In: Drugs and the cell cycle (A. M. Zimmermann, G. M. Padilla, I. L. Cameron, Eds.). Academic Press New York and London 1973.

- ISSELBACHER, K. J., and W. A. JONES: Alterations of glucose metabolism in viral and toxic liver injury. Gastroenterology 46, 424 - 433 (1964).
- IVERSEN, O. H.: Cell kinetics in Burkitt lymphoma. Europ. J. Cancer 10, 155 (1974).
- JACOBS, S. J.: The mode of action of hydroxyurea. Ph. D. Thesis. Columbia University (1968).
- JAFFÉ, J. J.: Diurnal mitotic periodicity in regenerating rat liver. Anat. Rec. 120, 935 - 954 (1954).
- KELLY, L. S., and E. L. DOBSON: Evidence concerning the origin of liver macrophages. Br. J. Exp. Pathol. 52, 88 - 99 (1971).
- KIM, J. H., A. S. GELBARD, and A. G. PEREZ: Action of hydroxyurea on the nucleic acid metabolism and viability of HeLa cells. Cancer Res. 27, 1301 - 1305 (1967).
- KIM, J. H., A. G. PEREZ, and B. DJORDJENIE: Studies on imbalanced growth in synchronized HeLa cells. Cancer Res. 28, 2443 - 2447 (1968).
- KLEIN, H. O. und K. J. LENNARTZ: Chemotherapy after synchronization of tumor cells. Semin. Hemat. 11, 203 (1974).
- KLEIN, H. O., K. J. LENNARTZ, R. GROSS, M. EDER und R. FISCHER: In-vivo und in-vitro Untersuchungen zur Zellkinetik und Synchronisation menschlicher Tumorzellen. Dtsch. med. Wschr. 97, 1273 - 1282 (1972).
- KLEIN, H. O., H. WIDMER und L. GROSSMAN: Die histochemische Bestimmung der Lipaseaktivität der Leber. Zbl. allg. Path. path. Anat. 28, 295 - 300 (1952).

- KLINGE, O. und J. MATHYL: Tageszeitliche Mitose-Rhythmen in der teilhepatektomierten Rattenleber. Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 2, 154 - 162 (1969).
- KOSTERLITZ, H. W.: In: Liver function (R. W. Brauer, ed.) Publ. No 4. Washington, D. C. Amer. Inst. Biol. Sci. (1958).
- KRAKOFF, J. H., N. C. BROWN, and P. REICHARD: Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. Cancer Res. 28, 1559 - 1565 (1968).
- KRASILINIKOVA, N. V.: Twenty-four-hour mitotic activity in reparative regeneration of the salivary gland, liver and epidermis of the albino mice. Bull. Exptl. Biol. Med. 56, 96 - 99 (1963).
- LEA, M. A., D. SASOVETZ, A. MUSELLA, and H. P. MORRIS: Effects of hydroxyurea and 6-mercaptapurine on growth and some aspects of carbohydrate metabolism in regenerating and neoplastic liver. Cancer Res. 30, 1994 - 1999 (1970).
- LEBLOND, C. P., and B. E. WALKER: Renewal of cell populations. Physiol. Rev. 36, 255 - 276 (1956).
- LE BOUTON, A. V.: Reactions and extent of the zone of intensified protein metabolism in the liver acinus. Currents in modern Biol. 3, 4 - 8 (1969).
- LE BOUTON, A. V.: Protein synthesis in the rat liver acinus after injection of actinomycin D: A radioautographic study. Currents in modern Biology. 3, 353 - 358 (1971).
- LERNER, H. J., and G. L. BECKLOFF: Hydroxyurea administered intermittently. J. Am. Med. Assoc. 192, 1168 - 1170 (1965).

- LOONEY, W. B.: The replication of deoxyribonucleic acid in hepatocytes. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 46, 609-698 (1960).
- LOONEY, W. B., R. C. CAMPBELL, and B. E. HOLMES: The effect of irradiation on the replication of deoxyribonucleic acid in hepatocytes. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 46, 698 - 708 (1960).
- LOONEY, W. B., L. O. CHANG, and F. W. BANGHART: The rate of DNA replication at the molecular, chromosomal, cellular, and intracellular levels in regenerating rat liver. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 57, 972 - 978 (1967).
- LOUD, A. V.: Description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. J. Cell Biol. 37, 27 - 46 (1968).
- Mac DONALD, R. A., A. E. ROGERS, and G. S. PEGHET: Regeneration of the liver: Relation of regenerative response to size of partial hepatectomy. Lab. Invest. 11, 544 - 548 (1962).
- MARGOLIS, S., F. S. PHILIPPS, and S. S. STEINBERG: The cytotoxicity of methotrexate in mouse small intestine in relation to inhibition of folic acid reductase and of DNA synthesis. Cancer Res. 31, 2037 - 2046 (1971).
- MAURER, W., B. SCHULTZE, A. C. SCHMEER und V. HAAK: Autoradiographic studies on the mode of growth in jejunal crypt cells of the mouse. J. Microscopy 96, 181 - 198 (1972).
- MEISTER, v. V.: Recreation des Lebergewebes nach Abtragung ganzer Leberlappen. Beitr. Path. Anat. 15, 1 - 116 (1894).
- MENDELSON, M. L.: The growth fraction: a new concept applied to tumors. Science 132, 1496 (1960 a).

- MENDELSON, M. L.: Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C_3H mouse. II. Growth and survival of cells labeled with thymidine. J. nat. Cancer Inst. 25, 485 - 500 (1960 b).
- MENDELSON, M. L.: Autoradiographic analysis of cell proliferation in spontaneous breast cancer of C_3H mouse. III. The growth fraction. J. nat. Cancer Inst. 28, 1015 - 1029 (1962 a).
- MENDELSON, M. L.: Chronic infusion of tritiated thymidine into mice tumors. Science 135, 213 - 215 (1962 b).
- MIZUTINI, A.: Cytochemical demonstration of ornithine carbamoyl transferase activity in liver mitochondria of rat and mice. J. Histochem. Cytochem. 16, 172 - 180 (1968).
- MOHLER, W. S.: Cytotoxicity of hydroxyurea (NSC-32965). reversible by pyrimidine deoxyribosides in a mammalian cell line grown in vitro. Cancer Chemotherapy Rept. 34, 1 - 6 (1964).
- MONJARDINO, J. P. P. V., and A. J. Mac GILLIVARY: RNA and histone metabolism in small lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. Exp. Cell Res. 60, 1 - 15 (1970).
- MOORE, E. C.: The effects of ferrous ion and dithioerythritol on inhibition by hydroxyurea of ribonucleotide reductase. Cancer Res. 29, 291 - 295 (1969).
- NECAS, E., and J. NEUWIRT: Feedback regulation by red cell mass of the sensitivity of the erythropoietin-producing organ to hypoxia. Blood 36, 754 (1970).

- NOLTE, J., and D. PETTE: Microphotometric determination of enzymic activity in single cells in cryostat section. I. Application of the gel film technique to microphotometry and studies on the intralobular distribution of succinate dehydrogenase activities in the rat liver. *J. Histochem. Cytochem.* 20, 567 - 576 (1972).
- NORTH, R. J.: The mitotic potential of fixed phagocytes in the liver as revealed during the development of cellular immunity. *J. Exp.* 130, 315 - 326 (1969).
- NOVIKOFF, A. B., and E. ESSNER: The liver cell. Some new approaches to its study. *Am. J. Med.* 29, 102 - 131 (1960).
- OEHLERT, W., W. HÄMMERLING und F. BÜCHNER: Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der DNS-Synthese in der regenerierenden Leber der Ratte nach Teilhepatektomie. *Beitr. Path. Anat.* 126, 91 - 112 (1962).
- OEHLERT, W., J. KARASEK und H. BERTEMAN: Untersuchungen zur normalen und gesteigerten Zellneubildung im mehrschichtigen Plattenepithel der Schweineepidermis. *Beitr. Path. Anat.* 134, 395 - 417 (1956).
- PETERS, R.: Die Mitosehäufigkeit in der Rattenleber in Abhängigkeit von der Tageszeit, dem Gewicht der Tiere und der Ernährung. *Z. Naturforsch.* 17 b, 164 - 168 (1962).
- PETTE, D. und H. BRANDAU: Enzym-Histogramme und Enzymaktivitätsmuster der Rattenleber. Nachweis Pyridinnukleotidspezifischer Dehydrogenasen im Gelschichtverfahren. *Enzym. biol. clin.* 6, 70 - 122 (1966).
- PFEIFFER, S. E., and L. J. TOLMACH: Inhibition of DNA synthesis in HeLa cells by hydroxyurea. *Cancer Res.* 27, 124 - 129 (1967).

- PHILIPS, F. S., S. S. STERNBERG, A. P. CRONIN, and P. M. VIDAL: Cytotoxicity and disposition of hydroxyurea and the hydroxylamines in the rats. Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 5, 50 (1964).
- PHILIPS, F. S., S. S. STERNBERG, H. S. SCHWARTZ, A. P. CRONIN, J. E. SODERGREN, and P. M. VIDAL: Hydroxyurea. I. Acute cell death in proliferating tissues in rats. Cancer Res. 27, 61 - 74 (1967).
- PILGRIM, C. K., K. J. LENNARTZ, K. WEGENER, S. HOLLWEG und W. MAURER: Autorendiographische Untersuchungen über tageszeitliche Schwankungen des H^3 -Index und des Mitoseindex bei Zellarten der ausgewachsenen Maus, des Rattenfetus sowie bei Ascites Tumorzellen. Z. Zellforsch. 68, 138 - 154 (1965).
- PINKUS, H.: Examination of the epidermis by the strip method. II. Biometric data on regeneration of the human epidermis. J. Invest. Dermatol. 19, 431 - 446 (1952).
- PLAGEMAN, P. G., and J. ERBE: Intracellular conversion of deoxyribonucleotides by Novikoff rat hepatoma cells and effects of hydroxyurea. J. Cell. Physiol. 83, 321 - 336 (1974).
- POGO, P. G. T., and J. R. KATZ: Early events in lymphocyte transformation by phytohaemagglutinin. 2. Synthesis and phosphorylation of nuclear proteins. Differentiation 2, 119 (1974).
- POHLE, K., K. MENG, and E. MATHIES: Die 24h-Mitoserhythmik beim S_2 -Ascites-Sarkom und beim Ehrlich-Ascites Karzinom der weißen Maus. Z. Krebsforsch. 64, 208 - 214 (1961).

POLLAK, R. D., and H. S. ROSENKRANZ: Metabolic effects of hydroxyurea on BHK-21 cells transformed with polyoma virus. *Cancer Res.* 27, 1214 - 1224 (1967).

POST, J., and J. HOFFMAN: Effects of 5-iodo-2-deoxyuridine upon the replication of ileal and spleen cells in vivo. *Cancer Res.* 29, 1859 - 1865 (1969).

QUASTLER, H., and F. G. SHERMAN: Cell population kinetics in the intestinal epithelium of the mouse. *Exp. Cell Res.* 17, 420 - 438 (1959).

RABES, H.: Beeinflussung der Proliferationsaktivität normaler und maligner Geschwülste durch Hypophysektomie. *Z. Krebsforsch.* 72, 176 - 184 (1969).

RABES, H., H. WRBA und H. BRÄNDLE: Synthesis of deoxyribonucleic acid in the liver of hypophysectomized rats after partial hepatectomy. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. (N-Y.)* 120, 244 - 246 (1965).

RABES, H. M. und H. BRÄNDLE: Beziehungen zwischen RNS- und DNS-Synthese bei der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* 1, 317 - 322 (1968).

RABES, H. M., and H. BRÄNDLE: Synthesis of RNA, Protein and DNA in the liver of normal and hypophysectomized rats after partial hepatectomy. *Cancer Res.* 29, 817 - 822 (1969).

RABES, H. M., G. ISELER, S. CZICHOS, and H.-V. TU CZEK: Synchronization of hepatocellular DNA synthesis in regenerating rat liver by continuous infusion of hydroxyurea. *Cancer Res.* 37, 1105 - 1111 (1977).

- RABES, H. M. und H.-V. TU CZEK: Quantitative autoradiographische Untersuchungen zur Heterogenität der Leberzellproliferation. Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 6, 302 - 312 (1970).
- RABES, H. M. und H.-V. TU CZEK: Zellproliferation in der partiell resezierten Rattenleber nach akuter Intoxikation durch Allylformiat. Beitr. Path. Anat. 143, 14 - 28 (1971).
- RABES, H. M., H.-V. TU CZEK und H. BRÄNDLE: Allylformiatvergiftung bei experimentell ausgelöster Leberregeneration. Klin. Wschr. 46, 450 - 451 (1968).
- RABES, H. M., H.-V. TU CZEK, and R. WIRSCHING: Kinetics of hepatocellular proliferation after partial hepatectomy as a function of structural and biochemical heterogeneity of the rat liver. In: R. Lesch, W. Reutter (Eds): Liver regeneration after experimental injury, p. 35 - 55, Stratton Intercontinental Medical Book Corp. (1975).
- RABES, H. M., R. WIRSCHING, and H.-V. TU CZEK: Dauer des Leberzellzyklus nach partieller Hepatektomie. Naturwissenschaften 59, 221 - 222 (1972).
- RABES, H. M., R. WIRSCHING, H.-V. TU CZEK, and G. ISELER: Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. Cell Tissue Kinet. 9, 517 - 532 (1976).
- RAJEWSKY, M. F.: Synchronization in vivo: Kinetics of a malignant cell system following temporary inhibition of DNA synthesis with hydroxyurea. Exp. Cell Res. 60, 269 - 276 (1970).

RAJEWSKY, M. F., D. F. HÜLSER und E. FABRICIUS: Untersuchungen zur Synchronisation in vivo: Temporäre Inhibition der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff in normalen und malignen Säugerzellsystemen. *Z. Krebsforschung* 76, 266 - 292 (1971).

RAPPAPORT, A. M.: Betrachtungen zur Pathophysiologie der Leberstruktur. *Klin. Wschr.* 38, 561 - 577 (1960).

RAPPAPORT, A. M.: Acinar units and the pathophysiology of the liver. In: *The Liver* (Ch. Rouiller, ed.), Vol. I, p. 265 - 328. New-York-London, Academic Press (1963).

RAPPAPORT, A. M.: The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. *Beitr. Path.* 157, 215 - 243 (1976).

RAPPAPORT, A. M., A. J. BOROWY, W. M. LOUGHEED, and W. N. LOTTO: Subdivision of hexagonal liver lobules into a structural and functional unit. *Anat. Rec.* 119, 11 - 33 (1954).

REITH, A., B. SCHÜLER, and W. VOGEL: Quantitative und qualitative elektronen mikroskopische Untersuchungen zur Struktur des Leberläppchens normaler Ratten. *Z. Zellforsch.* 89, 225 - 240 (1968).

ROMSDAHL, M. M.: Synchronization of human cell lines with colcemid. *Exp. Cell Res.* 50, 463 - 467 (1968).

ROSENKRANZ, H. S., and H. C. CARR: Studies with hydroxyurea. II. Prolonges exposure of *E. coli* to hydroxyurea. *J. Bacteriol.* 92, 178 - 185 (1966).

ROSENKRANZ, H. S., and H. C. CARR: Hydroxyurea and *Escherichia coli* nucleotide diphosphate reductase. *Cancer Res.* 30, 1926 - 1927 (1970).

- ROSENKRANZ, H. S., H. C. CARR, and R. D. POLLAK: Studies with hydroxyurea. VI. Effect of hydroxyurea on the metabolism of sensitive and resistant strains of *E. coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* 149, 228 - 245 (1967).
- ROSENKRANZ, H. S., A. J. GARRO, J. A. LEVY, and H. S. CARR: Studies with hydroxyurea. I. The reversible inhibition of bacterial DNA synthesis and the effect of hydroxyurea on the bacterial action of streptomycin. *Biochim. Biophys. Acta.* 114, 501 - 545 (1960).
- ROSENKRANZ, H. S., and S. J. JACOBS: Mode of action of hydroxyurea: Detection of an active intermediate. VII. Intern Congress Biochim., Tokyo, 1967, Abstracts p. 640.
- ROSENKRANZ, H. S., S. J. JACOBS, and H. C. CARR: Studies on hydroxyurea. VIII. The deoxyribonucleic acid of hydroxyurea treated cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 161, 428 - 441 (1968).
- ROSENKRANZ, H. S., R. D. POLLAK, and R. M. SCHMIDT: Biologic effects of isohydroxyurea. *Cancer Res.* 29, 209 - 218 (1969).
- RUBIN, A. D., and H. L. COOPER: Evolving patterns of RNA metabolism during transition from resting state to active growth in lymphocytes stimulated by phytohaemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 54, 469 - 476 (1965).
- RUBY, J. R., L. E. SCHEVING, S. B. GRAY, and K. WHITE: Circadian rhythm of nuclear DNA in adult rat liver. *Exp. Cell Res.* 76, 136 - 142 (1973).

SASSE, D.: Chemomorphologie der Glykogensynthese und des Glykogengehaltes während der Histogenese der Leber. *Histochemie* 20, 159 - 176 (1969).

SASSE, D. und J. KÖHLER: Die topochemische Verlagerung von Funktionseinheiten des Glykogenstoffwechsels in der Leber durch Allylformiat. *Histochemie* 18, 325 - 336 (1969).

SHEVING, L. E., and J. E. PAULY: Daily mitotic fluctuations in the epidermis of the rat and their relation to variations in spontaneous activity and rectal temperature. *Acta Anat. (Basel)* 43, 337 - 345 (1960).

SCHREML, W., O. BODE, E. BOCK, W. HEIT, and B. KUBANEK: Different action of suicidal doses of tritiated thymidine and hydroxyurea on murine haematopoietic cells. *Cell Tissue Kinet.* 7, 517 - 527 (1974).

SCHULTZE, B.: Die Orthologie und Pathologie des Nucleinsäure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm. In: *Handbuch der Allgem. Pathologie*, 2. Bd. Teil V, S. 466. Springer Verlag, Heidelberg-New York (1968).

SCHULTZE, B., V. HAAACK, A. C. SCHMEER, and W. MAURER: Autoradiographic investigation on the cell kinetics of crypt epithelia in the jejunum of the mouse. Confirmation of steady state growth with constant frequency distribution of cells throughout the cycle. *Cell Tissue Kinet.* 5, 131 - 145 (1972).

SCHUMACHER, H. H.: Histochemical distribution pattern of respiratory enzymes in the liver lobule. *Science* 125, 501 - 503 (1957).

- SCHWARTZ, H. S., M. GARAFALO, S. S. STERNBERG, and F. S. PHILIPS: Hydroxyurea: Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in regenerating liver of rats. *Cancer Res.* 25, 1867 - 1870 (1965).
- SHARKIS, S. J., J. LoBue, P. ALEXANDER, JR., F. RAKOWITZ, A. WEITZ-HAMBURGER, A. S. GORDON: Circadian variations in mouse hematopoiesis. II. Sex differences in mitotic indices of femoral diaphysal marrow cells. *Proc. Exp. Biol. Med.* 138, 494 - 496 (1971).
- SIGDESTAD, C. P., and S. LESHER: Photo-reversal of the circadian rhythm in the proliferative activity of the mouse small intestine. *J. Cellular Physiol.* 78, 212 (1971).
- SINCLAIR, W. K.: Hydroxyurea: Differential lethal effects on cultured mammalian cells during the cell cycle. *Science* 150, 1729 (1965).
- SINCLAIR, W. K.: Hydroxyurea: Effects on Chinese Hamster cells grown in culture. *Cancer Res.* 27, 297 - 308 (1967).
- SINDELCHIKOVA, V. V.: Changes in the circadian rhythm of mitotic activity of lymphocytes of the thymus and peripheral lymph nodes after immunization. *J. exptl. Med.* 134, 97 (1971).
- STÖCKER, E.: Der Proliferationsmodus in Niere und Leber. *Verh. Dtsch. Ges. Pathologie* 50, 53 - 74 (1966).
- STÖCKER, E.: Growth and regeneration in parenchymatous organs of the rat. 2. Meeting of the Europ. Study Group for Cell Proliferation. *Abstr. Papers*, p. 80 - 82 (1968).

STÖCKER, E. und H.-W. ALTMANN: Die DNS-Synthese in Leberparenchymzellen und Gallengangsepithelien von normalen und mit Thioacetamid behandelten Ratten. *Naturwissenschaften* 51, 15 (1964).

STÖCKER, E. und W. BOECKER: Zur Leberregeneration der Ratte nach Teilhepatektomie während akuter CCl_4 -Intoxikation. *Experientia* (Basel) 26, 763-765 (1970).

STÖCKER, E. und W.-D. HEINE: Regeneration of liver parenchyma under normal and pathological conditions. *Beitr. path. Anat.* 144, 400-408 (1971).

STÖCKER, E., B. SCHULTZE, W.-D. HEINE und H. LIEBSCHER: Wachstum und Regeneration in parenchymatösen Organen der Ratte. Autoradiographische Untersuchungen mit ^3H -Thyminidin. *Z. Zellforsch.* 125, 306-331 (1972).

STÖCKER, E., E. TEUBNER und S. ROSENBUSCH: Die DNS-Synthese als Funktion des Alters in Leber und Niere der Ratte. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 48, 295-299 (1964).

STUBBLEFIELD, E.T., and R. KLEVEOS: Synchronization of Chinese hamster cells by reversal of colcemid inhibition. *Exp. Cell Res.* 40, 660-664 (1965).

TERASIMA, T., and L.J. TOLMACH: Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells. *Exp. Cell Res.* 30, 344-362 (1963).

THURMAN, W.G.: Symposium on Hydroxyurea. *Cancer Chemotherapy Rept.* 40, 1-78 (1964).

THURMAN, W.G., C. BLOEDDY, C.D. HOWE, W.C. LEWIN, P. DAVIES, M. LANE, M-P. SULLIVAN, and K.M.A. GRIFFITH: Phase I: Study of hydroxyurea. *Cancer Chemotherapy. Rpt.* 29, 103 (1963).

- TOMASHEFSKY, P., and P. TANNENBAUM: Macromolecular metabolism in renal compensatory hypertrophy. I. Protein synthesis. Lab. Invest. 21, 358 - 364 (1969).
- TU CZEK, H.-V.: Autoradiographische Untersuchungen zur Topik der RNA- und DNA-Synthese in der regenerierenden Leber. Diss., München 1970.
- TU CZEK, H.-V. und H. M. RABES: Verlust der Proliferationsfähigkeit der Hepatocyten nach subtotaler Hepatektomie. Experientia 27, 526 (1971).
- TU CZEK, H.-V. und H. M. RABES: Autoradiographische und biochemische Untersuchungen zum Übertritt der Hepatocyten von der G₁- in die S-Phase nach partieller Hepatektomie. Z. Zellforschung 142, 399 - 408 (1973 a).
- TU CZEK, H.-V. und H. M. RABES: Autoradiographische Untersuchungen über intralobuläre Differenzen der Flußrate von Hepatocyten in das S-Kompartiment in Frühstadien nach partieller Hepatektomie. Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 15, 55 - 63 (1973 b).
- TU CZEK, H.-V., W. SKORUPPA und H. M. RABES: Zellkinetische Untersuchungen zur Interferenz zwischen Proliferations- und Funktionsstoffwechsel in der regenerierenden Rattenleber nach Applikation von Phenobarbital. Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 17, 347 - 361 (1975).
- UCHIYAMA, T., N. FAUSTO, J. L. van LANCKER: Molecular mechanism of liver regeneration. V. The effect of x-radiation on the incorporation of ¹⁴C-orotic acid into rapidly labeled nuclear ribonucleic acid. J. Biochem. 241, 991 - 996 (1966).
- WACHSTEIN, M.: Enzymatic histochemistry of the liver. Gastroenterology 37, 525 - 537 (1959).

WEIBEL, E. R., W. STÄUBLI, H. R. GNÄGI, and F. A. HESS:
Correlated morphometric and biochemical studies on the
liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods,
and normal morphometric data for rat liver. J. Cell
Biology 42, 68 - 91 (1969).

WEINBREN, K., E. WOODWARD: Delayed incorporation of ^{32}P
from orthophosphate into deoxyribonucleic acid of rat
liver after subtotal hepatectomy. J. exp. Path. 45,
442 - 449 (1964).

WIDMAN, J.-J., and H. D. FAHIMI: Proliferation of mono-
nuclear phagocytes (Kupffer cells) and endothelial
cells in regenerating rat liver. Am. J. Pathol. 80,
349 - 360 (1975).

WILSON, J. W.: Diurnal rhythm of mitotic activity in the
liver of the mouse. Anat. Rec. 101, 672 - 673 (1948).

WILSON, J. G., W. J. SCOTT, E. G. RITTER, R. FRADKIN:
Comparative distribution and embryotoxicity of hydroxy-
urea in pregnant rats and rhesus monkeys. Teratology
11, 169 - 178 (1975).

WIRSCHING, R.: Quantitative autoradiographische Unter-
suchungen zur Kinetik der Leberzellproliferation nach
partieller Hepatektomie. Diss. München, 1974.

YABRO, J. W., B. J. KENNEDY, and C. P. HARNUM: Hydroxy-
urea inhibition of DNA synthesis in ascites tumor.
Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 53, 1033 - 1035 (1965 a).

YABRO, J. W., W. G. NIEHAUS, and C. P. BARNUM: Effect
of hydroxyurea on regenerating rat liver. Biochem.
Biophys. Res. Commun. 19, 592 - 597 (1965 b).

YOUNG, G. W., and S. HODAS: Hydroxyurea: Inhibitory effect on DNA metabolism. Science 146, 1172 - 1174 (1964).

YOUNG, C. W., G. SCHOCHETMAN, S. HODAS, and U. E. BALIS: Inhibition of DNA synthesis by hydroxyurea: structure activity relationships. Cancer Res. 27, 535 - 540 (1967).

YOUNG, C. W., G. SCHOCHETMAN, and D. A. KARNOFSKY: Hydroxyurea-induced inhibition of deoxyribonucleotide synthesis: studies in intact cells. Cancer Res. 27, 526 - 534 (1967).

ZAKI, F. G.: Maximum mitosis and water content in regenerating rat liver. Z. Naturforsch. 9b, 239 - 241 (1954).

Lebenslauf

Als Tochter des Direktors Erwin Bacher und seiner Ehefrau Johanna, geb. Leiter, wurde ich am 2.2.1944 in Schorndorf geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Kuchen und des Gymnasiums in Geislingen/Steige legte ich am 25.3.1966 am Wirtschaftsgymnasium in Göppingen die Reifeprüfung ab. Zwei Semester studierte ich Veterinärmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität in München (Vorphysikum am 27.2.1967), anschließend Humanmedizin (Physikum am 6.10.1969; Staatsexamen am 20.12.1972). Danach folgte ein Jahr als Medizinalassistentin an der Chirurgischen und I. Medizinischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses München-Harlaching sowie an der II. Medizinischen Abteilung des Internen Krankenhauses Neuwittelsbach in München (Approbation am 11.3.1974). 1973 heiratete ich Herrn Dr. med. Heinz-Volker Tuzcek.

